

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
"FEDERICO II"**

**DOTTORATO DI RICERCA IN BIOCHIMICA E
BIOLOGIA CELLULARE E MOLECOLARE
(XIX CICLO)**

**MECCANISMI DI INIBIZIONE TRASCRIZIONALE
DEL RETROVIRUS HIV-1 AD OPERA DEL
REPRESSORE $I\kappa B-\alpha$**

DOCENTE GUIDA:
CH.MA PROF.SSA ILEANA QUINTO

DOTTORANDO:
DOTT. GIUSEPPE FIUME

COORDINATORE: CH.MO PROF. GIUSEPPE D'ALESSIO

ANNO ACCADEMICO 2006/2007

INDICE

SOMMARIO	pag. III
SUMMARY	pag. IV
INTRODUZIONE	pag. 1
<i>1.1 Il promotore del virus HIV-1</i>	pag. 1
<i>1.2 HIV-1 Tat: Struttura e funzione</i>	pag. 3
<i>1.3 NF-κB: struttura, funzione e regolazione</i>	pag. 6
<i>1.4 IκB-α: struttura, funzione e regolazione</i>	pag. 7
<i>1.5 Scopo del lavoro</i>	pag. 11
MATERIALI E METODI	pag. 12
<i>2.1 Plasmidi</i>	pag. 12
<i>2.2 Colture cellulari, trasfezioni e saggi luciferasi</i>	pag. 14
<i>2.3 Produzione dei virioni “pseudotipizzati” ed infezioni “single-round”</i>	pag. 15
<i>2.4 Saggio d’integrazione virale</i>	pag. 16
<i>2.5 Produzione di stocks virali ed infezione di cellule in coltura</i>	pag. 16
<i>2.6 Analisi Statistica</i>	pag. 17
<i>2.7 Estratti cellulari e Western Blotting</i>	pag. 17
<i>2.8 Interazioni per GST pull-down</i>	pag. 18
<i>2.9 Co-immuno precipitazioni</i>	pag. 20
<i>2.10 Microscopia Confocale</i>	pag. 20
RISULTATI	pag. 22
<i>3.1 IκB-α reprime la transattivazione mediata da Tat e la replicazione di HIV-1 in modo sia dipendente che indipendente da NF-κB</i>	pag. 22
<i>3.2 La sequenza di IκB-α dall’amminoacido 72 al 287 è richiesta per l’inibizione del transattivatore virale Tat</i>	pag. 28
<i>3.3 IκB-α lega il dominio di Tat ricco in arginine</i>	pag. 31
<i>3.4 Tat lega la sesta anchirina di IκB-α</i>	pag. 34
<i>3.5 IκB-α provoca la traslocazione di Tat dal nucleo al citoplasma</i>	pag. 37
DISCUSSIONE	pag. 43
<i>4.1 Rilevanza dell’interazione IκB-α/Tat nel ciclo virale di HIV-1</i>	pag. 44
BIBLIOGRAFIA	pag. 47
RINGRAZIAMENTI	pag. 50

SOMMARIO

L'espressione del virus HIV-1 è regolata dall'interazione di fattori trascrizionali cellulari che interagiscono con il promotore virale LTR. In particolare, tale promotore contiene due siti per NF- κ B ed è fortemente inibito da I κ B- α S32/36A, forma non degradabile del repressore di NF- κ B, I κ B- α . Poiché virus privi dei siti per NF- κ B nell'LTR sono in grado di trascrivere e replicare efficientemente, abbiamo ipotizzato che I κ B- α potesse inibire la trascrizione di HIV-1 con un meccanismo differente dalla repressione di NF- κ B. Per valutare tale possibilità, abbiamo analizzato le interazioni fisiche e funzionali di I κ B- α con il transattivatore virale Tat, fattore indispensabile per la replicazione virale.

In questo studio, abbiamo osservato che I κ B- α lega, tramite la sequenza dall'amminoacido 263 al 269, la proteina Tat al livello della regione ricca in arginine. Abbiamo, altresì, osservato che la sequenza di I κ B- α richiesta per inibire la proteina Tat comprende gli amminoacidi dal 72 al 287 ed include il segnale di localizzazione nucleare (aa. 110-120), il segnale di esportazione nucleare C-terminale (aa. 269-280) ed il sito di legame alla proteina Tat (aa. 263-269). I κ B- α agisce, quindi, come un potente repressore della trascrizione di HIV-1 inibendo i fattori trascrizionali NF- κ B e Tat che sono i maggiori protagonisti nell'attivazione trascrizionale e nel processo di elongazione dei trascritti del virus HIV-1.

Questo nuovo meccanismo di regolazione della trascrizione di HIV-1 potrebbe essere estremamente utile nello sviluppo di nuove strategie terapeutiche per l'AIDS.

SUMMARY

The expression of HIV-1 is regulated by cellular transacting factors that interact with the viral promoter LTR. In particular, HIV-1 LTR contains two tandem NF- κ B sites and it is potently inhibited by I κ B- α S32/36A, a proteolysis-resistant inhibitor of NF- κ B, I κ B- α . The evidence that viral strains lacking the NF- κ B enhancer are competent for transcription and replication raises the question whether I κ B- α represses the HIV-1 transcription by mechanisms distinct from NF- κ B inhibition. To test this possibility, we have analyzed the functional and physical interactions of I κ B- α with HIV-1 Tat transactivator, which is indispensable for viral replication. In this study, we reported that I κ B- α binds the arginine rich domain of Tat by the sequence spanning from amino acid 263 to 269. The sequence of I κ B- α required for Tat inhibition spans from amino acid 72 to 287 and includes the nuclear localization signal (aa. 110-120), C-terminal nuclear export signal (aa. 269-280) and the binding site for Tat (aa. 263-269). I κ B- α acts as a potent repressor of HIV-1 transcription by inhibiting both the NF- κ B and Tat transacting factors, which are major players in the transcriptional activation and elongation of HIV-1 transcripts. This novel mechanism of HIV-1 transcription regulation could assist in the development of novel strategies for AIDS therapy.

INTRODUZIONE

1.1 Il promotore del virus HIV-1

Il promotore di HIV-1 è costituito dalle sequenze LTR al 5' ed al 3' del genoma virale retrotrascritto ed integrato nel genoma cellulare (1). Nella sequenza LTR possiamo distinguere le seguenti regioni (Fig. 1):

1) Il promotore basale che è localizzato nella regione nucleotidica -46/-78 rispetto al sito d'inizio della trascrizione (Inr) e contiene una TATAA box canonica e tre siti di legame per il fattore trascrizionale eucariotico Sp1. La TATAA box è riconosciuta dalla *TATA box binding protein* (TBP), elemento del complesso d'inizio della trascrizione dipendente da RNA polimerasi II. TBP si associa con altri fattori cellulari, detti TAFs (*TBP Associated Factor*), che mediano nuove interazioni con i fattori trascrizionali Sp1, NF-κB e con il transattivatore virale Tat. Il risultato di tali complesse interazioni è la stabilizzazione e l'incremento della velocità di formazione del complesso d'inizio della trascrizione a livello del promotore virale.

2) Un *enhancer* localizzato nella regione nucleotidica -103/-82 rispetto al sito d'inizio della trascrizione costituito da due sequenze di legame per i fattori trascrizionali della famiglia NF-κB (2).

3) L'elemento di regolazione negativa (NRE) che è localizzato nella regione nucleotidica -120/-103 rispetto al sito d'inizio della trascrizione, e contiene una serie di siti di legame per fattori trascrizionali di origine cellulare, quali AP-1, NFAT-1, USF e GRE (2). Il ruolo svolto da questi fattori nella regolazione dell'espressione genica di HIV-1 dipende dal contesto cellulare. NRE contiene anche elementi di regolazione negativa della trascrizione virale, in quanto la

delezione di questa regione determina un piccolo ma significativo aumento dell'espressione genica e della replicazione virale.

4) Il “core promoter” localizzato nella regione nucleotidica -30/+50 rispetto al sito d'inizio della trascrizione, e che comprende la regione d'inizio *Inr* ed una regione ricca in pirimidine.

5) La regione TAR (Trans Activation Response Element) che si estende dal nt +1 al nt +59 rispetto al sito d'inizio della trascrizione. La regione TAR, trascritta come 5' sequenza leader non tradotta del trascritto virale, svolge un ruolo di regolazione dell'espressione virale in quanto genera una struttura RNA a forma di stelo-ansa richiesta per il legame di Tat. Inoltre, in prossimità del sito d'inizio della trascrizione, sono presenti un elemento “iniziatore” SSR, un induttore di piccoli trascritti IST, numerosi siti di legame per i fattori trascrizionali eucariotici, quali LBP1, LBP2, USF/TFH1, UBP2, CTF/NF1 ed NF-κB (2). IST è un elemento autonomo situato a valle di molti promotori dipendenti da RNA polimerasi II ed è localizzato nella regione nucleotidica da -5 a + 80 rispetto al sito d'inizio della trascrizione e si sovrappone alla sequenza TAR .

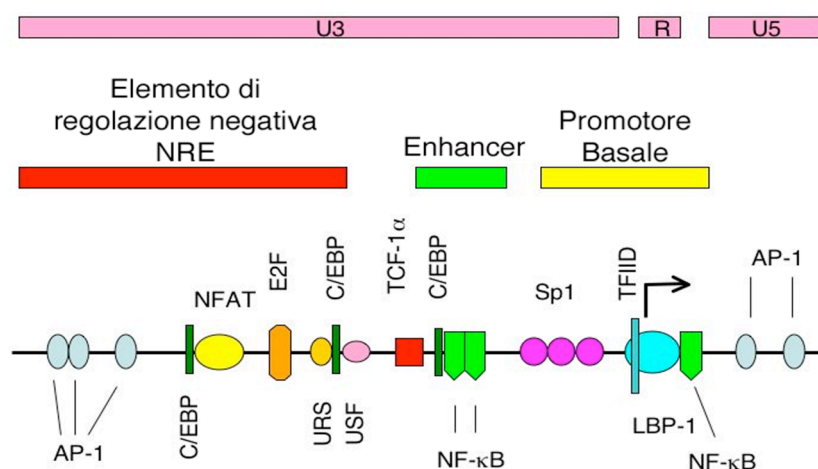


Fig.1- Promotore del virus HIV-1 (LTR)

1.2 HIV-1 Tat: Struttura e funzione

Tat è una proteina nucleare di 86-101 amminoacidi codificata da due esoni separati ed assemblati in seguito a splicing nel corso della trascrizione precoce del DNA virale. Il primo esone di Tat è localizzato nella regione centrale del genoma virale, tra i geni *vpr* ed *env*, e codifica per gli amminoacidi 1-72, i quali formano il dominio d'attivazione del promotore virale; il secondo esone si sovrappone ai geni *env* e *rev*, ma con differente quadro di lettura, e codifica per gli amminoacidi 73-101 (3). Il primo esone di Tat contiene i seguenti domini funzionali: a) un dominio N-terminale acido (aa. 1-20) ricco in proline; b) un dominio altamente conservato (aa. 21-39), contenente 7 cisteine, richiesto per la formazione di dimeri della proteina e per l'interazione di Tat con alcuni fattori trascrizionali; c) un motivo RKGLGI (aa. 40-48) che assieme al dominio ammino-terminale ed al dominio ricco in cisteine forma il dominio minimo di attivazione; d) un dominio basico RKKRRQRRR (aa. 49-72) ricco in residui di lisina ed arginina richiesto per il legame di Tat alla regione TAR RNA e contenente un segnale di localizzazione nucleare (NLS).

Il secondo esone di Tat, contenente il dominio carbossi-terminale, non è necessario per la transattivazione né per l'elongazione del trascritto virale. Questa regione possiede il motivo RGD richiesto per il legame di Tat ai recettori integrinici delle membrane cellulari. L'interazione con i recettori integrinici permette a Tat di funzionare come proteina esogena ormonale e di regolare alcuni eventi cellulari come l'apoptosi ed il ciclo cellulare (4). Tat è una funzione essenziale per la trascrizione e replicazione di HIV-1. Infatti, l'efficienza della trascrizione virale, in presenza di Tat, è cento volte superiore. L'attività Tat richiede il legame diretto alla regione TAR RNA che forma una

struttura a “stelo-ansa” altamente stabile e resistente alle nucleasi. In particolare, il dominio basico di Tat interagisce con i residui U23, U38 e U40 di TAR e la sequenza UCU del “*bulge*” di TAR (5).

In assenza di Tat, l’RNA polimerasi II si dissocia rapidamente dal DNA stampo virale, producendo prevalentemente trascritti brevi che terminano a livello della regione TAR (Fig. 2A). Ad opera dell’attività trascrizionale di NF- κ B ed Sp1, si ha comunque la sintesi di piccole quantità di RNA messaggero di 9 Kbp, da cui viene prodotto Tat (6) (Fig. 2A). Il legame di Tat alla regione TAR determina la formazione di un complesso di elongazione che causa un notevole aumento della produzione dei livelli dei trascritti lunghi ad opera dell’RNA polimerasi II (7) (Fig. 2B). Una volta prodotta, la proteina Tat si localizza in prossimità del complesso trascrizionale tramite legame con TAR RNA. Tat è associata al complesso chinasi TAK (Tat-Associated Kinase) costituito da ciclina T1 e CDK9, una serina/treonina-chinasi. Pertanto, CDK9, veicolata tramite Tat al promotore virale, iperfosforila l’estremità carbossi-terminale (CTD) della subunità maggiore dell’RNA polimerasi II, convogliata sul promotore tramite l’interazione con TFIID ed altri componenti dell’apparato trascrizionale basale. Questa modifica aumenta la processività dell’RNA polimerasi II che può trascrivere in maniera efficiente l’intero genoma di HIV-1 (Fig. 2B). La ciclina T1 è il componente del complesso TAK che favorisce la formazione di un complesso ternario stabile con Tat e TAR RNA (8) (Fig. 2B). TAK può associare il complesso di pre-inizio della trascrizione anche in assenza di Tat (9). L’interazione di TAK con il complesso di pre-inizio della trascrizione può essere mediata dall’associazione della ciclina T1 con i fattori trascrizionali Sp1 (10) ed NF- κ B (11). NF- κ B, infatti,

lega la regione ammino-terminale della ciclina T1, mentre Sp1 lega la regione carbossi-terminale. E', quindi, possibile che entrambi i fattori cooperino per convogliare la ciclina T1 sul promotore virale. Pertanto, i fattori trascrizionali cellulari Sp1 ed NF- κ B svolgono un ruolo di iniziatori ed elongatori della trascrizione virale in assenza di Tat, rendendo possibile la produzione di una percentuale di trascritti completi virali richiesti per la sintesi dell'elongatore virale Tat (Fig. 2A).

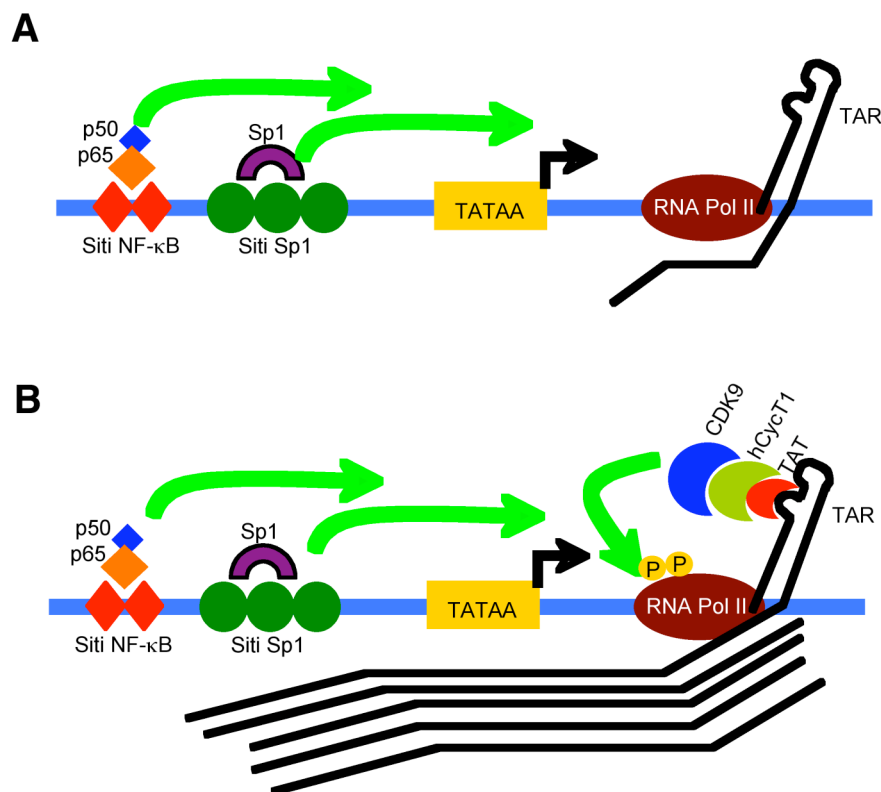


Fig. 2 – Meccanismo trascrizionale di HIV-1 in presenza ed assenza di Tat. *A.* In assenza di Tat, l'RNA polimerasi II produce prevalentemente trascritti abortivi; grazie all'attività trascrizionale di NF- κ B ed Sp1 si formano comunque dei lunghi trascritti da cui verrà prodotta Tat. *B.* Tat lega la regione TAR, recluta il complesso CycT1/CDK9 che provoca l'iper-fosforilazione del dominio CTD dell'RNA-polimerasi II, risultante in un forte aumento nella produzione di trascritti lunghi.

Tat è coinvolta anche nel *remodelling* della cromatina che normalmente esercita un forte ruolo repressivo sull'inizio della trascrizione. Infatti, Tat recluta sull'LTR acetil-transferasi come CBP, P/CAF and GCN5 , che determinano iperacetilazione degli istoni H3 e H4 su distinte regioni nucleosomali prima dell'inizio della trascrizione virale (12-14). Tat, quindi, regola le modificazioni della cromatina, l'assemblaggio del complesso di inizio della trascrizione e l'elongazione della trascrizione tramite una serie di sequenziali e coordinati eventi che determinano alti livelli di trascritti virali.

1.3 NF- κ B: struttura, funzione e regolazione

La famiglia di fattori trascrizionali NF- κ B è costituita da proteine aventi in comune un dominio N-terminale di 300 amminoacidi, conosciuto come dominio RHD (Rel Homology Domain), omologo alla proteina virale v-Rel originariamente isolata dal retrovirus aviario Rev-T (15). Il dominio RHD è responsabile della dimerizzazione in forma di omo- ed etero-dimeri delle proteine NF- κ B, del legame al sito *consensus* nel DNA, della traslocazione nucleare delle proteine e dell'interazione con i membri della famiglia I κ B (16). Le proteine NF- κ B a tutt'oggi identificate sono: v-Rel, c-Rel, RelA (p65), RelB, NF- κ B 1 (p50) ed NF- κ B 2 (p52) con i relativi precursori p105 e p100. Il sito di legame al DNA dei complessi NF- κ B è la sequenza *consensus* 5'-GGGRNYYYCC-3'; differenze nel *consensus* e nel tipo di dimero possono contribuire alla modulazione specifica di un gene in un determinato contesto cellulare (17). L'attività di NF- κ B è strettamente regolata dall'interazione con gli inibitori della famiglia I κ B (18). Nella maggior parte delle cellule, il dimero NF- κ B più rappresentato è costituito dalle subunità p50 e p65 e si trova nel

citoplasma complessato con l'inibitore I κ B- α . L'associazione di I κ B- α con p50/p65 maschera il segnale di localizzazione nucleare del complesso NF- κ B, impedendo la traslocazione nucleare di NF- κ B ed il suo legame al DNA (19) (Fig. 3). In risposta a segnali extracellulari specifici attivanti il complesso ad attività chinasi IKK, le proteine I κ B sono fosforilate su serine specifiche, ubiquitinate su lisine e, quindi, degradate da proteasomi. Tali eventi consentono il rilascio dei complessi NF- κ B che traslocano nel nucleo dove legano il DNA *consensus* specifico ed attivano la trascrizione di geni NF- κ B-dipendenti.

Il gene di I κ B- α è regolato da NF- κ B. Infatti, il promotore di I κ B- α presenta due siti κ B (20); quindi, la degradazione di I κ B- α è seguita da attivazione di NF- κ B risultante nella trascrizione di I κ B- α e risintesi dell'inibitore (21). Le proteine I κ B- α neosintetizzate traslocano nel nucleo dove si associano con i complessi NF- κ B, inibendone il legame al DNA (17).

1.4 I κ B- α : struttura, funzione e regolazione

Le proteine I κ B regolano l'attività NF- κ B e sono espresse in maniera tessuto-specifica. La famiglia I κ B è costituita dalle proteine I κ B- α , I κ B- β , I κ B- ϵ , I κ B- γ e Bcl-3 (16). Queste proteine sono caratterizzate da una sequenza di sei o più ancore, strutture in grado d'interagire con altre proteine, da un dominio di regolazione N-terminale fosforilabile in seguito a *signaling*, ed un dominio carbossi-terminale contenente il motivo PEST richiesto per la degradazione basale delle stesse proteine (22). I κ B- α è una proteina di 37 kDa ed è l'inibitore meglio caratterizzato della famiglia I κ B; esso è costituito da:

- un dominio N-terminale, detto SRD (*Signal Receiving Domain*), che mappa dall'amminoacido 1 all'amminoacido 72 ed è richiesto per la degradazione inducibile della proteina (19). Infatti, in tale dominio sono presenti i residui di serina 32 e 36 fosforilabili dal complesso della I κ B-kinase (IKK) (22) e le lisine 21 e 22 ubiquitinate dopo la fosforilazione (23). Nel dominio ammino-terminale è anche presente un segnale di esporto nucleare (NES) compreso tra gli amminoacidi 45 e 55 (24-27);
- un dominio di sei anchirine che mappano successivamente dall'amminoacido 73 all'amminoacido 280. Nel loro complesso, le sei anchirine formano una struttura detta ARD (*Ankyrin Repeats Domain*). Il dominio ARD media l'interazione di I κ B- α con i domini Rel delle proteine NF- κ B ed altre proteine cellulari. L'integrità di questa regione ed il dominio di dimerizzazione Rel sono richiesti per la stabilità del complesso I κ B/NF- κ B ritenuto nel citoplasma (5). La seconda anchirina di I κ B- α contiene un segnale di localizzazione nucleare (NLS) che mappa dall'amminoacido 110 all'amminoacido 120 (28-30). La sesta anchirina contiene un segnale di esporto nucleare (NES) compreso tra gli amminoacidi 269 e 280 (31, 32);
- un dominio acido costituito da prolina, acido glutammico, serina e treonina (dominio PEST) che mappa dall'amminoacido 280 a 291 e regola la degradazione basale di I κ B- α . Infatti, I κ B- α privo della regione PEST ha un'emivita maggiore rispetto alla proteina I κ B- α selvatica (33, 34). Nel dominio PEST sono presenti due siti di fosforilazione da casein-chinasi II (CK2) che mappano tra gli amminoacidi 283 e 286 il primo, e tra gli amminoacidi 291 e 294 il secondo. La fosforilazione di questi siti a livello

dei residui di serina 283 e treonina 291, rispettivamente, determina la degradazione di I κ B- α da parte della calpaina (35-37);

- un dominio carbossi-terminale compreso tra gli amminoacidi 291 e 317 che contiene un altro sito che mappa tra gli amminoacidi 299 e 302, fosforilabile da CK2 a livello della treonina 299 (35-37).

I κ B- α lega prevalentemente etero-dimeri p50/p65 nel citoplasma (Fig. 3). L'interfaccia tra I κ B- α e NF- κ B contiene diversi siti d'interazione tra il repressore e le due subunità p50 e p65 del complesso NF- κ B (38). Il dominio ARD di I κ B- α è costituito dall'impilamento ricurvo di anchirine che con la superficie concava interagisce con il dominio di dimerizzazione RHD delle proteine p50 e p65 del complesso NF- κ B. In particolare, le anchirine 1 e 2 contattano il sito NLS e la regione carbossi-terminale di p65. Le anchirine da 2 a 6 contattano la porzione carbossi-terminale del dominio RHD di p65 e p50 (38). Inoltre, quando associata ad I κ B- α , p65 subisce un cambio conformazionale che impedisce la fosforilazione mediata da PKA del proprio residuo serinico 276. Pertanto, l'associazione con I κ B- α impedisce al complesso p50/p65 la traslocazione nucleare ed il legame al DNA. Una volta degradato I κ B- α , lo smascheramento dei domini NLS delle subunità p50 e p65 permettono la traslocazione nucleare del complesso NF- κ B ed il legame al DNA (39).

La degradazione di I κ B- α , regolata da *signaling*, avviene per modifiche post-traduzionali della proteina in maniera sequenziale. Diversi stimoli chimici o fisici segnalano per la degradazione di I κ B- α , quali TNF- α , IL-1, il lipopolisaccaride, l'RNA virale a doppio filamento o radiazioni ionizzanti (18). Questi segnali attivano il complesso IKK che fosforila le serine 32 e 36 di I κ B-

α . I κ B- α , così fosforilato, è riconosciuto dal complesso Fbox/WD40E3RS/bTrCP ed ubiquitinato a livello dei residui di lisina 21 e 22 dal complesso ubiquitinante SKp1-Cullin-Fbox (SCF) di tipo E3 (Fig. 3). Questa modifica permette la degradazione di I κ B- α dal complesso dei proteasomi (23). Sostituzioni amminoacidiche, anche in una sola delle due serine, impediscono la degradazione di I κ B- α (40). La fosforilazione di I κ B- α precede la sua degradazione ma non distrugge il complesso NF- κ B/I κ B- α (41). Infatti, una volta fosforilata la proteina I κ B- α , ancora legata ad NF- κ B, deve essere ubiquitinata sulle lisine 21 e 22, riconosciuta dal proteasoma ed immediatamente degradata (40) (Fig. 3).

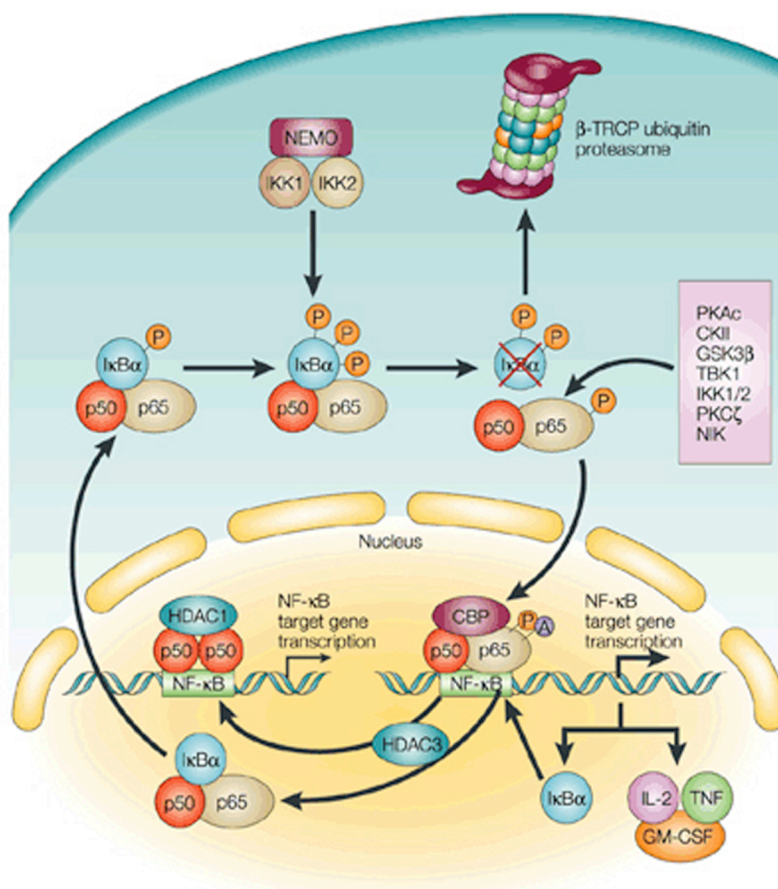


Fig. 3 – Vie di attivazione e degradazione di NF- κ B.

1.5 Scopo del lavoro

L'espressione e replicazione di HIV-1 è regolata dall'LTR di HIV-1. Questo contiene due siti per il fattore NF- κ B ed è potentemente represso da I κ B- α S32/36A, un inibitore di NF- κ B non degradabile dal proteasoma (42-43). La delezione dei due siti NF- κ B dell'LTR virale riduce ma non abolisce l'attivazione trascrizionale di HIV-1 mediata da Tat (44-46). Inoltre, ceppi virali deleti dei siti NF- κ B possono replicare efficientemente (44-46). In base a tali evidenze, abbiamo ipotizzato che I κ B- α potesse reprimere la trascrizione di HIV-1 mediante inibizione di fattori trascrizionali diversi da NF- κ B. Per valutare tale possibilità, abbiamo analizzato le interazioni fisiche e funzionali di I κ B- α con il transattivatore virale Tat, fattore indispensabile per la replicazione virale, conducendo le seguenti analisi:

1. Analisi dell'inibizione della transattivazione mediata da Tat ad opera di I κ B- α indipendentemente dalla repressione su NF- κ B.
2. Analisi dell'inibizione ad opera di I κ B- α dell'espressione e replicazione virale indipendentemente dalla repressione su NF- κ B.
3. Studio dell'interazione funzionale di I κ B- α con Tat tramite saggi d'espressione *in transient* degli LTR di HIV-1 privi dei siti per NF- κ B.
4. Studio dell'interazione fisica di I κ B- α con Tat mediante esperimenti d'immunoprecipitazione *in vivo*, *in vitro* e GST-pull down;
5. Analisi della localizzazione intracellulare di Tat in presenza od assenza di I κ B- α .

MATERIALI E METODI

2.1 Plasmidi

I plasmidi pLTR*luc*, pLTR*luc*- Δ NF- κ B e pLTR*luc*- Δ Sp1, contengono le regioni U3 ed R del clone molecolare di HIV-1 pNL4-3 a monte del gene reporter *luciferasi* (44), rispettivamente, selvatiche, prive dei siti per il fattore trascrizionale NF- κ B oppure per Sp1. I plasmidi p3XFLAG-CMV-Tat, p3XFLAG-CMV-Tat C(22, 25, 27)A e p3XFLAG-CMV-Tat R(49-57)A, sono stati clonati amplificando la sequenza di Tat selvatica o mutata a partire dai vettori di espressione pGEX-2T-Tat, e ligando il prodotto di amplificazione, digerito con la coppia di enzimi EcoRI/XbaI, ad un vettore p3XFLAG-CMV-7.1, digerito con gli stessi enzimi di restrizione.

I plasmidi esprimenti i mutanti I κ B- α 120-317, 1-280, 1-269, 1-242, 72-287 e 72-269 sono stati costruiti amplificando la sequenza di I κ B- α con appropriate coppie di primers e ligando al vettore pCMV4-HA, digerito con HindIII/XbaI.

Il mutante I κ B- α 72-287 L(272, 274, 277)A è stato generato per mutagenesi sito-diretta del vettore d'espressione per il mutante I κ B- α 72-287 usando il primer
senso, 5'-
ATACAGCAGCAGCTGGGCCAGGCGACAGCAGAAAACGCGCAGAT
GCTGCCAGAGA-3', ed il primer antisenso, 5'-
CTGGCCCAGCTGCTGCTGTATCCGGGTGCTTGGGCGGCC-3', con le
triplette mutate indicate in grassetto.

Il mutante I κ B- α 1-317 N/C NES possiede entrambe le sequenze NES, all'ammino-terminale (N-NES) ed al carbossi-terminale (C-NES), non funzionali per sostituzione di leucine, cruciali per la funzione NES, in alanine. Esso è stato generato per mutagenesi sito-diretta del vettore d'espressione per

la proteina I κ B- α 1-317 utilizzando, al livello della N-NES, il primer senso 5'-AAGGAGCTGCAGGAGG**CGCGCGCGG**AGCCGCAGGAGGTG-3' ed il primer antisenso 5'- CTCCTGCAGCTCCTTGACCATGGAGTCCA-3', e al livello della C-NES le coppie di primer utilizzate per la costruzione del mutante I κ B- α 72-287 L(272, 274, 277)A. Le triplette mutate sono riportate in grassetto.

Il plasmide pGEX-2T-I κ B- α è stato costruito mediante amplificazione della sequenza I κ B- α a partire dal plasmide pCMV4-HA-I κ B- α e successiva ligasi al vettore pGEX-2T digerito con gli enzimi di restrizione BamHI/EcoRI.

I plasmidi pcDNA3 esprimenti I κ B- α ed i relativi mutanti sotto il promotore T7 sono stati costruiti per amplificazione dei geni I κ B- α , utilizzando i plasmidi pCMV4-HA-I κ B- α come stampo, seguita da ligazione al vettore pcDNA3, digerito con la coppia di enzimi di restrizione KpnI/XbaI.

Il plasmide pNL4-3.Luc.R⁻E⁻ Δ κ B è stato generato sostituendo il frammento XhoI/HindIII del plasmide pNL4-3.Luc.R⁻E⁻, che contiene il 3'LTR, con il frammento corrispondente del plasmide pLTR $_{luc}$ - Δ NF- κ B.

I plasmidi pNL-I κ B-M ed pNL-I κ B-as sono stati descritti in (37).

I plasmidi pNL- Δ κ B-I κ B-M e pNL- Δ κ B-I κ B-as sono stati costruiti digerendo con l'enzima NaeI i plasmidi virali pNL-I κ B-M e pNL-I κ B-as ed isolando i relativi frammenti di 2.35 Kb ed 1.61 Kb, rispettivamente. Tali frammenti contenevano la sequenza virale dal sito unico NaeI entro l'inserto di I κ B- α S32/36A-FLAG nella regione *nef* con una orientazione in senso od antisenso, rispettivamente, al sito NaeI di pNL4-3 (10346nt) presente nella regione fiancheggiante il genoma di HIV-1, a valle del 3'LTR. Questi frammenti sono stati ligati al vettore pBlueScript K⁺ digerito con NaeI per generare i plasmidi

“shuttle” pBSK-I κ B-M e pBSK-I κ B-as rispettivamente. I due siti κ B sono stati deleti per mutagenesi sito-diretta usando il primer senso, 5'-CGAGCTTGCTACAAGGGATCTAGATCCAGGGAGGCGTGGCCTGGG C-3', ed il primer antisenso 5'-TCCTTG TAGCAAGCTCGATGTCAGCAGTTCTTGAAGTAC-3', generando in questo modo i plasmidi pBSK- $\Delta\kappa$ B-I κ B-M e pBSK- $\Delta\kappa$ B-I κ B-as, rispettivamente. La sequenza dei siti κ B mutata è riportata in grassetto. Infine, i plasmidi virali pNL- $\Delta\kappa$ B-I κ B-M e pNL- $\Delta\kappa$ B-I κ B-as sono stati generati rimpiazzando i frammenti di 2.35Kb ed 1.61Kb con i frammenti corrispondenti di pBSK- $\Delta\kappa$ B-I κ B-M e pBSK- $\Delta\kappa$ B-I κ B-as.

2.2 Colture cellulari, trasfezioni e saggi luciferasi

Le cellule ad adherenza HeLa, MEF e 293T sono state cresciute in terreno di coltura DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) (GIBCO) mentre le cellule in sospensione Jurkat in RPMI (GIBCO). Ai mezzi di coltura è stato, inoltre, aggiunto FCS (*Fetal Calf Serum*) (GIBCO) al 10%, inattivato al calore, e 2mM di L-glutammina (GIBCO). Tutti i tipi cellulari sono stati mantenuti in incubatori a 37 °C e con atmosfera al 5% di CO₂.

Le colture cellulari, in fase esponenziale di crescita, sono state trasfettate con DNA plasmidico mediante il reagente FuGENE6 (Roche Diagnostic). Le quantità di DNA totale trasfettate sono state normalizzate mediante trasfezione del vettore vuoto Rc/CMV. Per i saggi luciferasi, il plasmide pSV- β -Gal è stato sempre cotrasfettato con i plasmidi LTR*luc* per monitorare l'efficienza di trasfezione. Quarantotto ore dopo la trasfezione le cellule sono state lisate nel *buffer* di lisi del sistema *Dual Light Luciferase System* (Tropix) e le attività

della luciferasi e della β -galattosidasi sono state misurate con lo stesso sistema in un luminometro (Turner Biosystem). Il rapporto tra l'attività della luciferasi e quella della β -galattosidasi è stato espresso come Unità Luciferasi Relative (RLU). I livelli di induzione sono stati calcolati rispetto al valore luciferasi ottenuto per gli estratti proteici delle cellule trasfettate solo con i plasmidi LTR luc , selvatici o mutati (pLTR luc , pLTR luc - Δ NF- κ B e pLTR luc - Δ Sp1).

2.3 Produzione dei virioni “pseudotipizzati” ed infezioni single-round

Le cellule 293T sono state trasfettate con i plasmidi pNL4-3.Luc.R E^- oppure pNL4-3.Luc.R E^- Δ κ B (10 μ g) ed il plasmide pVSV-G (10 μ g), esprime la proteina G del virus della stomatite vescicolare. Quarantotto ore dopo la trasfezione, è stato raccolto il sovranatante contenente i virioni, che venivano quantificati per saggio ELISA diretto contro la proteina virale p24gag.

Le cellule Jurkat (4×10^6) sono state trasfettate, mediante elettroporazione, con il plasmide pCMV4-HA-I κ B- α S32/36A (30 μ g) o il vettore vuoto Rc/CMV (30 μ g), oppure con siRNA diretto contro I κ B- α o siRNA di controllo (500 pmoli) (Dharmacon). Quarantotto ore dopo la trasfezione, le cellule venivano infettate con i virioni (500 ng di p24gag), pseudotipizzati con la proteina G, prodotti nelle cellule 293T, mediante la tecnica definita “*spinoculation*”(47). Quarantotto ore dopo l'infezione veniva misurata l'attività luciferasi.

2.4 Saggio d'integrazione virale

Il DNA genomico è stato estratto da aliquote di cellule (2×10^6) infettate con gli pseudovirioni NL4-3.Luc.R E^- o NL4-3.Luc.R E^- Δ κ B mediante il reagente TRIzol (Invitrogen) ed amplificato con primer senso MH531, 5'-

TGTGTGCCCCGTCTGTTGTGT-3', che si appaiava nella regione U5 dell'LTR, e con primer antisenso MH532, 5'-GAGTCCTGCGTCGAGAGAGC-3', che si appaiava al 5' del gene *gag*. La miscela di reazione (25 µL) conteneva DNA genomico (200 ng), i primer (600 nM) ed 1x di iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Il saggio di *Real-Time PCR* è stato eseguito in una macchina iCycler Apparatus (Bio-Rad). Le tappe del saggio comprendevano: un'iniziale denaturazione a 95°C per 8 minuti e successivamente 50 cicli costituiti da: a) 95°C per 10 secondi; b) 60°C per 10secondi; c) 72°C per 6secondi. La quantità di DNA virale è stata normalizzata alla quantità di GAPDH cellulare genomica. Il DNA genomico relativo al gene della GAPDH è stato amplificato usando il primer senso GAPDH-F, 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3', ed il primer antisenso GAPDH-R, 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'. Il numero di copie di HIV-1 totale presente per cellula è stato misurato come descritto da Brussel (48).

2.5 Produzione di stocks virali ed infezione di cellule in coltura

Gli *stocks* virali sono stati prodotti trasfettando le cellule 293T con i plasmidi virali (10 µg) pNL-IκB-M, pNL-IκB-as, pNL-ΔκB-IκB-M e pNL-ΔκB-IκB-as. Il sovrinatante veniva filtrato con un filtro da 0.40 µm e successivamente analizzato per misurare la produzione dei virioni tramite ELISA diretto contro la proteina virale p24 gag (34, 41). Le cellule Jurkat (5×10^4) sono state infettate con 0.3 ng di p24 dello stock virale; i sovrinatanti venivano raccolti ogni 3 giorni e contemporaneamente rimpiazzati con uguali volumi di mezzo fresco. I

sovrantananti raccolti sono stati saggiati per la presenza di p24gag, per saggio ELISA.

2.6 Analisi Statistica

I dati che abbiamo riportato vengono intesi come media \pm errore standard. Le differenze statisticamente significative tra le medie sono state stimate tramite test *t* di *Student*, a due code per dati non appaiati. Le differenze tra le medie sono state considerate come statisticamente significative al livello del 95%, quindi con $P \leq 0.05$.

2.7 Estratti cellulari e Western Blotting

Le cellule (5×10^6) sono state raccolte, lavate in PBS freddo e lisate in ghiaccio in 500 μ L di buffer di lisi contenente 50 mM di Tris-HCl a pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% di deossicolato di sodio, 0.2% di SDS, 2 mM EDTA, 1% di Triton X-100, 5 mM DTT ed 1x di cocktail di inibitori di proteasi (Roche). Dopo una centrifugazione a 15000g per 15 minuti a 4°C, il sovratanante è stato recuperato ed un'aliquota è stata risospesa in *loading buffer* (125mM di Tris-HCl a pH 6.8, 5% di SDS, 1% di blu di bromofenolo, 10% di β -mercaptoetanol e 25% di glicerolo) e caricata su un gel SDS-PAGE al 10%. Dopo la corsa elettroforetica, le proteine sono state trasferite su una membrana PVDF (Millipore), la quale è stata incubata con anticorpi primari per 2 ore e successivamente con anticorpi secondari (IgG anti-mouse o anti-rabbit, coniugate a perossidasi di rafano) (Amersham Biosciences) per 1 ora. Tali anticorpi, primari oppure secondari, erano diluiti, rispettivamente 1:1000 o 1:2000, in una soluzione di PBS contenente latte scremato al 5% (Bio-Rad). Le

proteine erano rivelate per chemiluminescenza utilizzando il sistema *Amersham ECL system* (Amersham Biosciences). Gli anticorpi primari utilizzati sono stati i seguenti: anti-HA (F7), anti-GST (B-14), anti-I κ B- α (C-15) ed *Normal Mouse Serum* (NMS) della casa produttrice Santa Cruz Biotechnology; anti-FLAG (M2) ed anti- γ -Tubulina della casa Sigma-Aldrich; anti-Caspasi-3 ed anti-PARP-proteolizzata della Cell Signaling Technology.

2.8 Interazioni per GST pull-down

Le proteine di fusione GST sono state prodotte in cellule batteriche *Escherichia Coli*, ceppo BL21. Per far esprimere le proteine di fusione GST, le colture batteriche (500 mL) sono state fatte crescere a 37° C con agitazione fino a fase esponenziale ad un'assorbanza a 590 nm pari a 0.5 O.D. e sono state indotte con 0.25 mM di isopropil- β -D-tiogalattopiranoside (IPTG) (Sigma-Aldrich) per 3 ore. I batteri sono stati lisati per sonicazione in buffer A (1x PBS, 1 mM DTT, 1 mM di PMSF ed 1x di cocktail di inibitori di proteasi) ed il lisato è stato chiarificato per centrifugazione a 27000g per 30 minuti a 4°C. Il sovranatante è stato incubato con 1 mL di resina glutatione-sefariosio al 50% (v/v) (Amersham Pharmacia) precedentemente equilibrata con Buffer A. Dopo un'incubazione su ruota a 4°C per 2h, la resina è stata lavata 5 volte con buffer A e sottoposte a lavaggio ad alte concentrazioni di sali (0.8M NaCl) per liberare le proteine di fusione dagli acidi nucleici batterici (49). Le proteine di fusione GST sono state eluite con 500 μ L di una soluzione 50 mM di Tris-HCl, 10 mM glutatione ed 1mM DTT. Le proteine di fusione GST eluite sono state dializzate contro un buffer di dialisi (1x PBS, 1mM DTT, 10% glicerolo) e aliquote (5-10 μ g) di queste sono state coniugate alla resina glutatione-

sefarosio (20 μ L) in 500 μ L di buffer di legame (50 mM Tris-HCl a pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% di deossicolato di sodio, 0.2% di SDS, 2 mM di EDTA, 3% di Triton X-100, 5 mM DTT, 1x cocktail di inibitori di proteasi). Le proteine di fusione coniugate alla resina glutatione-sefarosio sono state, quindi, recuperate per centrifugazione a 700 g per 5 minuti a 4°C ed incubate, su ruota a 4°C per 3 ore, con estratti cellulari (200 μ g) in 500 μ L di buffer di legame supplementato con albumina sierica bovina nella concentrazione di 1 mg/mL, adoperata per ridurre le interazioni aspecifiche. Per rimuovere gli acidi nucleici, gli estratti cellulari sono stati trattati con nucleasi micrococcica (0.2 unità/ μ L) per 30 minuti a 28°C. I complessi proteici sono stati recuperati per centrifugazione a 700 g per 5 minuti a 4°C, lavati in buffer di legame e risospesi in *loading buffer*. Le proteine sono state caricate su un gel SDS-PAGE al 10% e sottoposte a corsa elettroforetica. Le proteine sono state trasferite su una membrana PVDF ed analizzate con gli opportuni anticorpi, per immunoblotting.

I vettori di espressione pcDNA3 esprimenti la proteina I κ B- α selvatica oppure i relativi mutanti, sotto il controllo del promotore fagico T7, sono stati utilizzati come stampo per tradurre *in vitro* le proteine I κ B- α marcate con metionina [S^{35}] mediante il sistema TNT Quick Coupled Transcription/Translation Systems (Promega). Aliquote (10 μ L) di miscela di traduzione sono state incubate su ruota a temperatura ambiente per 3h con le proteine di fusione ricombinanti GST oppure GST-Tat (10 μ g) in 500 μ L di buffer di legame, supplementato con albumina sierica bovina 1 mg/mL. Dopo la normale procedura di *GST-pull down*, le proteine sono state separate mediante elettroforesi SDS-PAGE ed analizzate per autoradiografia e *immunoblotting*.

con anticorpi anti-GST.

2.9 Co-immuno precipitazioni

Le cellule sono state lisate in buffer di lisi contenente PBS, 1% di Triton X-100, 1x di cocktail di inibitori di protease. Gli anticorpi (2.5 µg) sono stati pre-incubati, su ruota a 4°C per 12 ore, con 20 µL di resina coniugata alla proteina G (*protein G-Sepharose*) (Amersham Biosciences) in 50 µL di buffer di immunoprecipitazione (PBS, 2% Triton X-100, 300 mM NaCl, 5 mM DTT, 1x cocktail di inibitori di protease). Successivamente, gli anticorpi legati alla resina *protein G-Sepharose* sono stati incubati con il lisato cellulare (500 µg) in 500 µL di buffer di immunoprecipitazione su ruota a 4°C per 12 ore. Gli immunocomplessi sono stati recuperati per centrifugazione a 700 g per 5 minuti a 4°C, lavati con buffer di immunoprecipitazione e risospesi in *SDS-loading buffer*. Le proteine sono state separate mediante elettroforesi 10% SDS-PAGE, trasferite su filtro PVDF e analizzate per immunoblotting.

2.10 Microscopia Confocale

A 24 h dalla trasfezione con i vettori di espressione per le proteine HA-IκB-α e/o per FLAG-Tat, le cellule HeLa sono state piastrate su vetrini trattati con poli-L-lisina, fissate e permeabilizzate utilizzando il sistema Cytofix/CytoPerm kit (BD Biosciences Pharmingen). Per analizzare la localizzazione intracellulare delle proteine HA-IκB-α e FLAG-Tat, la colorazione è stata effettuata utilizzando l'anticorpo monoclonale anti-FLAG-M2 coniugato a FITC (Sigma-Aldrich) oppure l'anticorpo rabbit-anti-HA seguito dall'anticorpo anti-rabbit-AlexaFluor568 (Molecular Probes). I nuclei sono stati colorati

mediante TO-PRO-3 ioduro (Molecular Probes). Le immagini sono state ottenute mediante un microscopio confocale Leica TCS-SP2 (Leica Mycrosystem) con un obiettivo ad immersione 63X Apo PLA ed un'apertura di 60 μm . Le immagini lungo la terza dimensione, “*z-stacks*”, sono state ottenute con una distanza tra i piani di 200 nm. La proteina FLAG-TAT è stata visualizzata per eccitazione mediante un laser ad argon a 488 nm ed un fotomoltiplicatore a voltaggio di 420 mV. Le proteine HA-I κ B- α sono state rivelate usando un laser al kripton a 568 nm ed un fotomoltiplicatore con voltaggio di 650 mV. I nuclei sono stati osservati con un laser al kripton a 613 nm ed un fotomoltiplicatore a voltaggio di 450 mV.

Per l'analisi quantitativa dei livelli di proteine nucleari e citosoliche, sono state valutate sezioni orizzontali del nucleo e del citoplasma di 30 cellule rappresentative. La misura dei livelli di proteine nucleari e citosolici, basata su fluorescenza, è stata eseguita mediante analisi dell'immagine utilizzando il programma *LEICA Scan TCS-SP2 software* (Leica Mycrosystem). Tutte le quantizzazioni sono state eseguite su immagini su scala di grigi ad 8-bit prive di pixel saturati. La fluorescenza media nucleare (FMN) e citosolica (FMC) è stata misurata come il rapporto, per ogni singola cellula, tra fluorescenza totale e pixel totali al livello nucleare o citosolico ($\text{FMN} = \text{Fluorescenza Totale} / \text{Pixel Nucleari}$ e $\text{FMC} = \text{Fluorescenza totale} / \text{Pixel Citosolici}$). La fluorescenza relativa nucleare (FRN) o la fluorescenza relativa citosolica (FRC) è stata calcolata come il rapporto tra la fluorescenza media nucleare (FMN) o citosolica (FMC) e la fluorescenza media dell'intera cellula ($\text{FMT} = \text{FMN} + \text{FMC}$) ($\text{FRN} = \text{FMN} / \text{FMN} + \text{FMC}$ e $\text{FRC} = \text{FMC} / \text{FMN} + \text{FMC}$) (50).

RISULTATI

3.1 I κ B- α reprime la transattivazione mediata da Tat e la replicazione di HIV-1 in modo sia dipendente che indipendente da NF- κ B

Per analizzare l'effetto di I κ B- α sull'attività trascrizionale di Tat, cellule HeLa sono state trasfettate *in transient* con un plasmide esprimente il gene della luciferasi sotto il controllo dell'LTR di HIV-1 selvatico (pLTR luc), deieto dei siti NF- κ B (pLTR luc - Δ NF- κ B) o dei siti Sp1 (pLTR luc - Δ Sp1) in presenza od assenza di Tat ed I κ B- α .

La delezione dei siti per NF- κ B oppure per Sp1 riduceva drasticamente l'espressione basale (Fig. 4A) e la transattivazione mediata da Tat dell'LTR di HIV-1 (Fig. 4C e D). I κ B- α inibiva l'attività trascrizionale di Tat, in modo dose dipendente, fino all' 80% per LTR selvatico (Fig. 4B) e fino al 60% nel caso del promotore deieto dei siti NF- κ B (Fig. 4C). L'evidenza che I κ B- α inibiva la transattivazione mediata da Tat dell'LTR privo dei siti NF- κ B indicava l'esistenza di un meccanismo di repressione trascrizionale differente dall'inibizione di NF- κ B. I κ B- α , inoltre, inibiva completamente la transattivazione mediata da Tat dell'LTR deieto dei siti per Sp1 (Fig. 4D); questa inibizione così forte era dovuta all'inibizione sia NF- κ B dipendente che NF- κ B indipendente della transattivazione dell'LTR. L'inibizione dell'LTR, inoltre, non era dovuta ad un effetto pro-apoptotico di I κ B- α poiché in cellule trasfettate con dosi crescenti di I κ B- α non si evidenziava proteolisi né di Caspasi-3 né della proteina PARP-1 [poli(ADP-ribosio)-polimerasi-1], tipici effetti apoptotici (Fig. 4E).

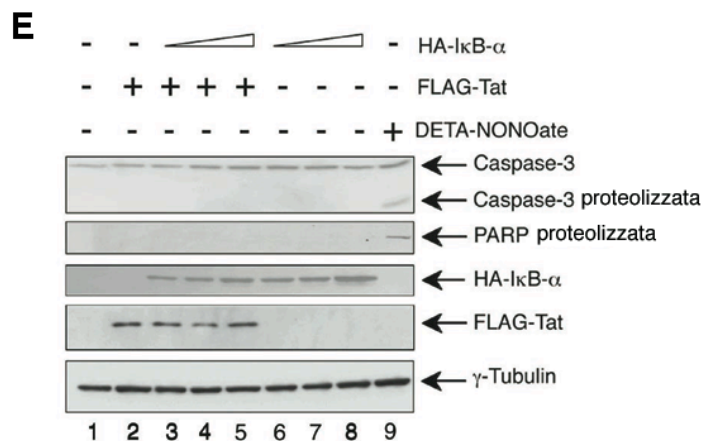
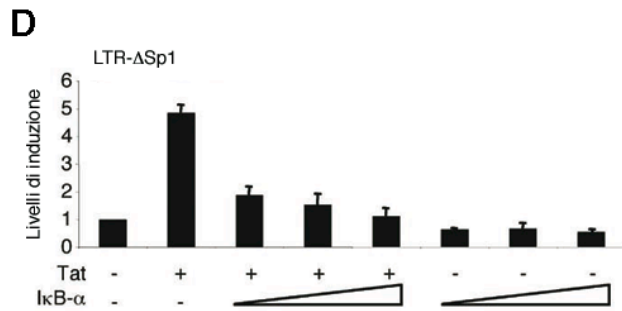
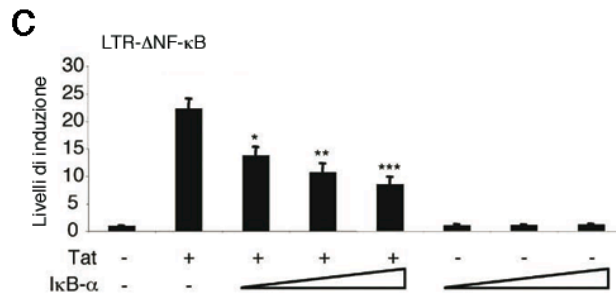
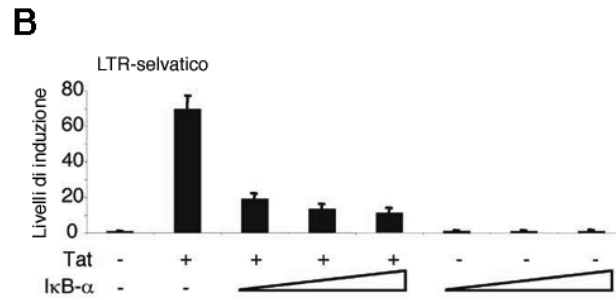
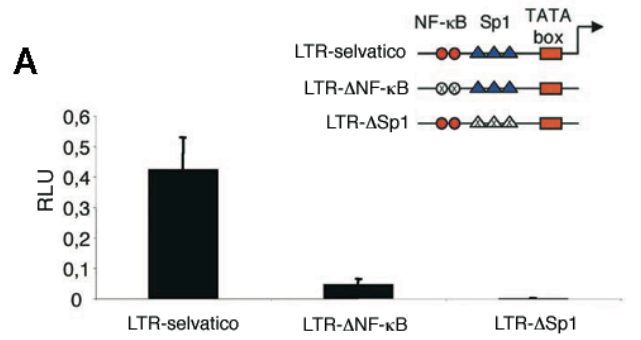


Fig. 4 – IκB-α inibisce la transattivazione dell’LTR di HIV-1 mediata da Tat indipendentemente dalla repressione di NF-κB.

A. Cellule HeLa (3×10^5) sono state trasfettate con i plasmidi pLTR $_{luc}$, pLTR $_{luc}$ -ΔNF-κB oppure pLTR $_{luc}$ -ΔSp1 (0.5 μg). L’attività luciferasi è stata misurata 48h dopo la trasfezione. *B, C e D.* Cellule HeLa (3×10^5) sono state trasfettate con i plasmidi pLTR $_{luc}$, pLTR $_{luc}$ -ΔNF-κB oppure pLTR $_{luc}$ -ΔSp1 (0.5 μg) in presenza od assenza di p3xFLAG-CMV-Tat (0.5 μg) e pCMV4-HA-IκB-α (0.5, 1 e 2 μg). L’attività luciferasi è stata misurata 48h dopo la trasfezione. Nella figura C gli asterischi indicano un’inibizione statisticamente significativa secondo il test *t* di Student (*, $P = 0.01$; **, $P = 0.002$; ***, $P = 0.0007$)

Successivamente, abbiamo analizzato l’effetto di IκB-α sull’espressione dei virus a singolo ciclo di replicazione (*single-round replication*) selvatici o privi dei siti per NF-κB. Cellule Jurkat sono state trasfettate con il plasmide codificante la forma di IκB-α resistente alla proteolisi, IκB-αS32/36A, oppure con il siRNA diretto contro il gene IκB-α, rispettivamente per aumentare o diminuire i livelli intracellulari di IκB-α. Le cellule così trasfettate sono state poi infettate con i virioni NL4-3.Luc.R⁻ E⁻, pseudotipizzati con la proteina G del virus VSV (virus della stomatite vescicolare), con il promotore selvatico oppure privo dei siti per NF-κB (NL4-3.Luc.R⁻ E⁻ ΔκB). L’espressione virale era significativamente ridotta dall’aumento dei livelli di IκB-α endogeni mentre era significativamente aumentata dall’abbassamento dei livelli intracellulari di IκB-α dovuta al silenziamento del gene IκB-α per *RNA interference* sia nell’infezione con il virione selvatico (Fig. 5A, pannello di sinistra) che con NL4-3.Luc.R⁻ E⁻ ΔκB (Fig. 5A, pannello di destra). Non è stata osservata nessuna differenza statisticamente significativa nel numero di virus integrati tra i differenti campioni (Fig. 5B). Questi risultati suggeriscono, quindi, che la quantità di IκB-α endogeno influenza l’espressione dei virus HIV-1, integrati nel genoma ospite, in modo inversamente proporzionale,

indipendentemente dalla presenza dei siti per il fattore trascrizionale NF- κ B nell'LTR di HIV-1.

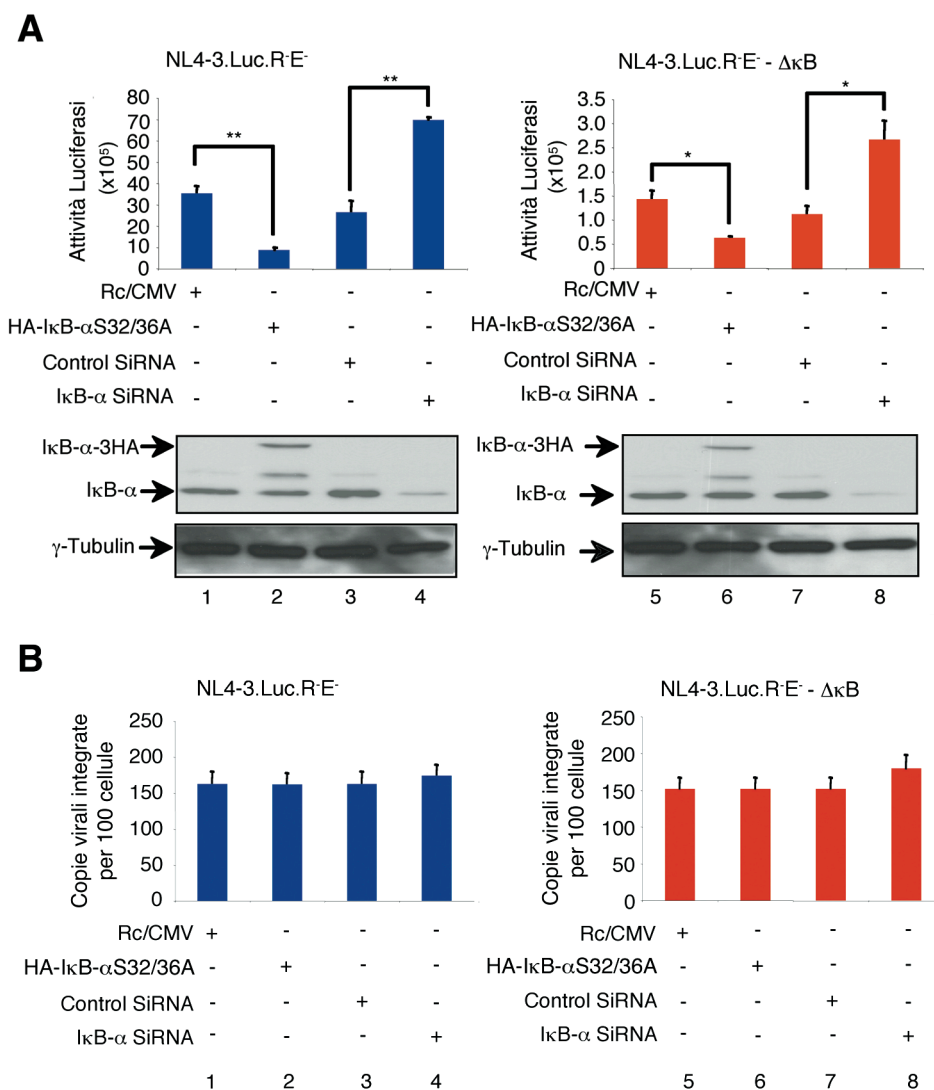


Fig. 5 – IkB- α inibisce l'espressione di virus privi dei siti per NF- κ B.

A. Cellule Jurkat (4×10^6) sono state elettroporate con pCMV4-HA-IkB- α o vettore vuoto Rc/CMV (30 μ g), IkB- α siRNA oppure siRNA di controllo (500 pmoli) e successivamente, infettate con i virioni (500 ng di p24), pseudotipizzati con la proteina VSV-G, NL4-3.Luc.R'E⁻, con LTR selvatico (pannello di sinistra), oppure privo dei siti per NF- κ B (NL4-3.Luc.R'E⁻ Δ κ B) (pannello di destra); l'espressione virale è stata monitorata misurando l'attività luciferasi degli estratti cellulari 48h dopo l'infezione. Gli asterischi indicano una differenza statisticamente significativa secondo il test *t* di Student (*, $P = 0,001$; **, $P = 0,0002$) Nel pannello in basso è mostrato, per Western blotting,

il livello di espressione di I κ B- α negli estratti cellulari. B. Le copie virali integrate nel DNA genomico sono state misurate per Real-Time PCR.

Per analizzare l'effetto di I κ B- α sulla replicazione di HIV-1 in assenza dei siti per NF- κ B nell'LTR virale, abbiamo costruito i plasmidi virali pNL- Δ κ B-I κ B-M e pNL- Δ κ B-I κ B-as, che portano il gene codificante I κ B- α S32/36A, inserito nella regione *nef* di HIV-1 con una orientazione in senso od antisenso, rispettivamente, e privi dei due siti κ B nell'LTR (Fig. 6A). Questi plasmidi derivavano dai plasmidi virali pNL-I κ B-M e pNL-I κ B-as, che oltre ad esprimere il genoma virale codificavano oppure no la proteina I κ B- α S32/36A-FLAG, rispettivamente.

Cellule Jurkat sono state infettate con i virioni HIV-1 con LTR selvatico (NL-I κ B-M e NL-I κ B-as) o privo dei due siti κ B (NL- Δ κ B-I κ B-M e NL- Δ κ B-I κ B-as), e la produzione dei virioni è stata misurata nel mezzo di coltura delle cellule per saggio ELISA contro la proteina p24. NL-I κ B-M risultava essere potentemente attenuato rispetto al virus di controllo NL-I κ B-as, grazie all'espressione della forma non proteolizzabile I κ B- α S32/36A (Fig. 6B). Anche il virus NL- Δ κ B-I κ B-M mostrava un'attenuazione statisticamente significativa rispetto al controllo NL- Δ κ B-I κ B-as (Fig. 6C). Tali risultati indicano che I κ B- α inibisce la replicazione di HIV-1 indipendentemente dall'*enhancer* NF- κ B nell'LTR di HIV-1 e supportano l'evidenza di meccanismi addizionali alla repressione di NF- κ B da parte di I κ B- α .

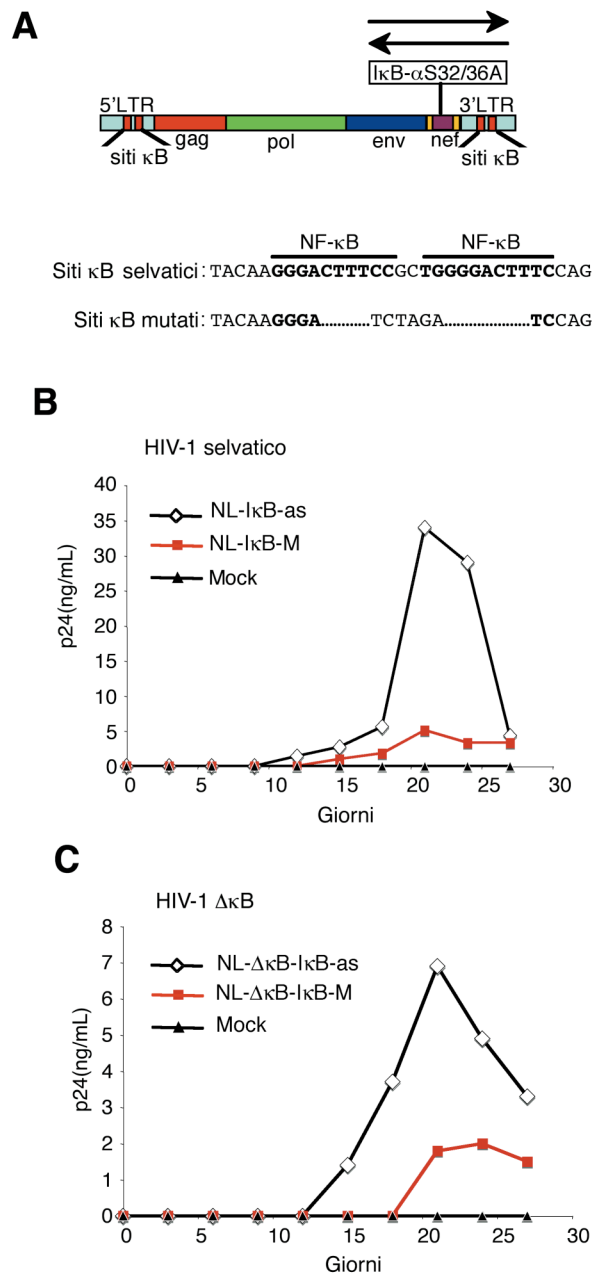


Fig. 6 - I κ B- α inibisce la replicazione di virus privi dei siti per NF- κ B.

A. Rappresentazione schematica del genoma virale di NL-I κ B-M e NL-I κ B-as (LTR selvatico) e di NL- $\Delta\kappa$ B-I κ B-M e NL- $\Delta\kappa$ B-I κ B-as (LTR privo dei siti per NF- κ B). *B, C.* Cellule Jurkat (5×10^4) sono state infettate con uguali quantità (0,3 ng di p24) di virus NL-I κ B-M ed NL-I κ B-as (HIV-1 selvatico) (*B*) oppure di virus NL- $\Delta\kappa$ B-I κ B-M e NL- $\Delta\kappa$ B-I κ B-as (HIV-1 $\Delta\kappa$ B) (*C*). La produzione di virioni, in un periodo di tempo di 28 giorni, è stata valutata misurando quantità di p24 nel surnatante della coltura.

3.2 La sequenza di IκB-α dall'amminoacido 72 al 287 è richiesta per l'inibizione del transattivatore virale Tat

Abbiamo analizzato l'effetto di IκB-α sull'attività di Tat in assenza del fattore trascrizionale NF-κB (p50/p65); per cui abbiamo valutato la transattivazione mediata da Tat in cellule MEF (fibroblasti murini embrionali) prive delle subunità p50 e p65 di NF-κB (MEF p50^{-/-} p65^{-/-}) (51-53). Poiché la ciclina T1 murina non permette la formazione di un complesso P-TEFb/Tat/TAR che determina un'efficiente attività trascrizionale (54), le cellule MEF p50^{-/-} p65^{-/-} sono state trasfettate con o senza ciclina T1 umana (hCycT1). IκB-α inibiva significativamente la transattivazione mediata da Tat dell'LTR privo dei siti per NF-κB, in un modo dose dipendente, sia in presenza che assenza di ciclina T1 umana (Fig. 7A); ciò escludeva la possibilità che IκB-α potesse reprimere la transattivazione mediata da Tat per inibizione della ciclina T1.

La sequenza di IκB-α è costituita da 317 amminoacidi. Tale sequenza comprende sei anchirine (dall'amminoacido 72 al 287), la sequenza NLS (dall'amminoacido 110 al 120), la sequenza N-NES (*Nuclear Export Signal* N-terminale dall'amminoacido 45-55) e la sequenza C-NES (*Nuclear Export Signal* C-terminale dall'amminoacido 265-277) (Fig. 7B).

Per analizzare le porzioni della proteina IκB-α richieste per l'inibizione di Tat indipendentemente dalla repressione su NF-κB, l'attività inibitoria dei mutanti di IκB-α è stata valutata in MEF p50^{-/-} p65^{-/-}, per espressione transiente dell'LTR privo dei siti NF-κB e Tat. I mutanti IκB-α, ottenuti per delezioni progressive della regione carbossi-terminale dall'amminoacido 317 al 280, inibivano significativamente l'attività di Tat mentre non era stata osservata nessuna inibizione da parte del mutante IκB-α 1-269, privo della regione C-

NES (Fig. 7C). Inoltre, delezioni della regione dall'amminoacido 269 al 242 di IκB-α non modificavano l'attività di Tat. Il mutante IκB-α 72-317, privo della regione ammino-terminale, inibiva significativamente Tat mentre il mutante IκB-α 120-317, privo della regione NLS, perdeva la capacità di inibire l'attività transattivante di Tat (Fig. 7C).

Tali risultati indicano che la sequenza di IκB-α dall'amminoacido 72 al 120 (contenente la sequenza NLS) e dall'amminoacido 269 al 280 (contenente la sequenza C-NES) sono entrambe richieste per l'inibizione di Tat. Tale dato è stato confermato dall'esperimento in cui il mutante IκB-α 72-287, che contiene sia la sequenza NLS che la sequenza C-NES, inibiva l'attività di Tat, mentre i mutanti IκB-α 72-269 e IκB-α 72-287 L(272, 274, 277)A, caratterizzati dalla delezione o da sostituzioni in alanine di leucine critiche (31) della C-NES, rispettivamente, perdevano la capacità di inibire la proteina Tat (Fig. 7C).

La perdita della capacità inibitoria dei mutanti IκB-α 120-317, IκB-α 72-269 e IκB-α 72-287 L(272, 274, 277)A è stata confermata anche a dosi più alte di plasmide codificante per i mutanti (Fig. 7D). I mutanti IκB-α mostravano uno stesso livello di espressione e nessuna correlazione è stata trovata tra il livello di espressione e l'attività inibitoria (Fig. 7E).

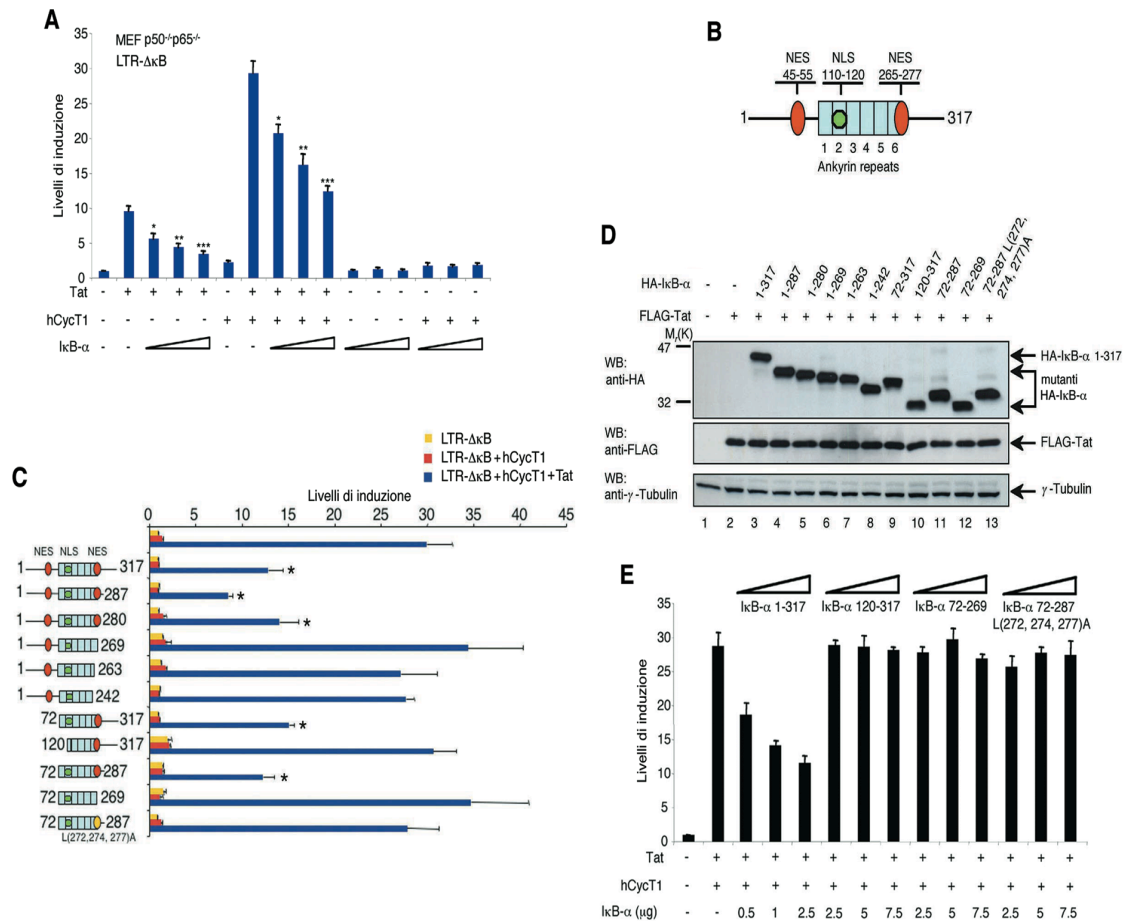


Fig. 7 – La sequenza di IκB-α dall'amminoacido 72 al 287 è necessaria per l'inibizione di Tat.

A. Cellule MEF p50^{-/-} p65^{-/-} (3×10^5) sono state trasfettate con pLTR Δ luc-ΔNF-κB (0,5 μg), con o senza p3xFLAG-CMV-Tat (0,5 μg), pRc/CMV-HA-hCycT1 (0,5 μg) e pCMV4-HA-IκB-α (0,5 1 e 2 μg). L'attività luciferasi è stata misurata 48h dopo la trasfezione. Gli asterischi indicano un'inibizione statisticamente significativa secondo il test *t* di Student (in assenza di hCycT1: *P* = 0.008; **, *P* = 0.0009; ***, *P* = 0.0002; in presenza di hCycT1: *, *P* = 0.006; **, *P* = 0.001; ***, *P* = 0.0001) **B.** Rappresentazione schematica di IκB-α. **C.** Cellule MEF (3×10^5) sono state trasfettate con pLTR Δ luc-ΔNF-κB (0,5 μg), con o senza p3xFLAG-CMV-Tat (0,5 μg), pRc/CMV-HA-hCycT1 (0,5 μg) e pCMV4-HA-IκB-α oppure i mutanti indicati (2 μg). Gli asterischi indicano un'inibizione statisticamente significativa secondo il test *t* di Student (IκB-α 1-317, *P* = 0.0017; IκB-α 1-287, *P* = 0.0001; IκB-α 1-280, *P* = 0.004; IκB-α 72-317, *P* = 0.0036; IκB-α 72-287, *P* = 0.0007). **D.** Estratti cellulari (20 μg) di MEF p50^{-/-} p65^{-/-} trasfettate con 3xFLAG-Tat e pCMV4-HA-IκB-α o i relativi mutanti sono state analizzate, per Western blotting, per valutare l'espressione dei geni trasfettati. **E.** Cellule MEF p50^{-/-} p65^{-/-} (3×10^5) sono state trasfettate con pLTR Δ luc-ΔNF-κB (0,5 μg), con o senza p3xFLAG-CMV-Tat (0,5 μg), pRc/CMV-HA-hCycT1 (0,5 μg) e pCMV4-HA-IκB-α oppure i mutanti privi del NLS o C-NES, IκB-α 120-317, IκB-α 72-269, IκB-α 72-287L(272, 274, 277)A, rispettivamente, alle dosi indicate.

3.3 I κ B- α lega il dominio di Tat ricco in arginine

Per verificare l'interazione fisica di I κ B- α con Tat, abbiamo eseguito un saggio di *GST pull-down* con estratti proteici da cellule trasfettate con il plasmide pCMV4-HA-I κ B- α , esprime la proteina I κ B- α fusa con l'epitopo HA. In tale esperimento la proteina GST-Tat legava la proteina I κ B- α , espressa in cellule HeLa, MEF e MEF p50^{-/-} p65^{-/-} (Fig. 8A corsie 1, 2 e 3). Il legame della GST-Tat alla proteina I κ B- α espressa in cellule MEF p50^{-/-} p65^{-/-} escludeva la possibilità che I κ B- α e Tat potessero essere in uno stesso complesso con le subunità p50 e p65 di NF- κ B. Inoltre I κ B- α non legava la proteina GST (Fig. 8A, corsie 4, 5 e 6). E' stato osservato anche il legame della proteina I κ B- α endogena di estratti di cellule HeLa con la GST-Tat (Fig. 8B, corsia 1). Il trattamento degli estratti cellulari con nucleasi micrococcica non influenzava il legame di I κ B- α alla proteina Tat (Fig. 8C, corsia 2), escludendo, così, la possibilità che l'associazione tra le due proteine fosse mediata dalla presenza di acidi nucleici.

Per analizzare i domini della proteina Tat impegnati nel legame ad I κ B- α , la proteina ricombinante GST-I κ B- α è stata incubata con estratti di cellule HeLa trasfettate con i plasmidi codificanti Tat selvatica, il mutante Tat C(22, 25, 27)A (mutante Tat nella regione ricca in cisteine che porta sostituzioni di cisteine in alanine) o il mutante Tat R(49-57)A (mutante Tat nella regione ricca in arginine che porta sostituzioni di arginine in alanine) (Fig. 8D). Tali proteine erano fuse all'epitopo commerciale FLAG. In esperimenti di *GST pull-down*, la proteina di fusione GST-I κ B- α legava la proteina Tat selvatica e la proteina mutante Tat C(22, 25, 27)A (Fig. 8E, corsie 2 e 4), mentre non

legava la proteina Tat R(49-57)A (Fig. 8E, corsia 3); inoltre, Tat ed i relativi mutanti non legavano la proteina GST (Fig. 8E, corsie 6-8).

L'associazione di I κ B- α con Tat è stata anche osservata *in vivo* mediante esperimenti di immunoprecipitazione di estratti di cellule HeLa trasfettate con i plasmidi esprimenti le proteine FLAG-Tat e HA-I κ B- α . I κ B- α immunoprecipitava con la proteina Tat selvatica o con la forma mutante Tat C(22, 25, 27)A (Fig. 8F, corsie 2 e 3), mentre non immunoprecipitava con la proteina Tat R(49-57)A (Fig. 8F, corsia 4). Insieme, questi risultati indicano che la regione di Tat ricca in arginine, che va dall'amminoacido 49 al 57, è richiesta per l'associazione con I κ B- α .

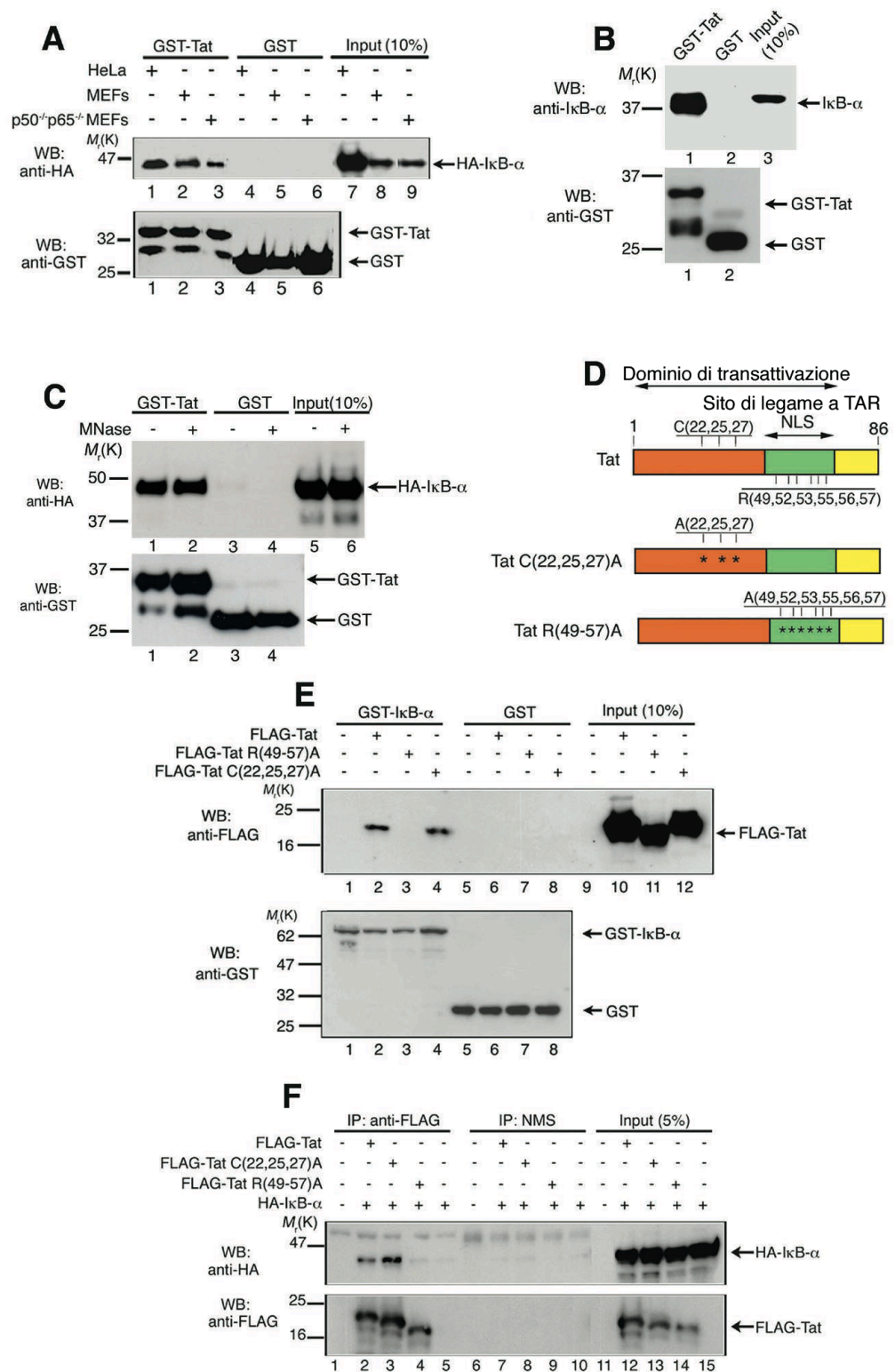


Fig.8 – IκB-α lega il dominio ricco in arginine della proteina Tat.

A. Cellule HeLa, MEF e MEF p50^{-/-} p65^{-/-} (1x10⁶) sono state trasfettate con pCMV4-HA-IκB-α (5 μg) e gli estratti cellulari sono stati incubati con le proteine ricombinanti GST-Tat o GST. In seguito al GST pull-down, i complessi proteici sono stati analizzati per Western blotting con anticorpi anti-

HA ed anti-GST. *B.* Estratti proteici da cellule HeLa (1 mg) sono stati incubati con GST-Tat o GST. In seguito al GST pull-down, i complessi proteici sono stati analizzati per Western blotting con anticorpi anti-I κ B- α (C-15) ed anti-GST. *C.* Cellule HeLa (1×10^6) sono state trasfettate con pCMV4-HA-I κ B- α (5 μ g) e gli estratti cellulari (200 μ g) sono stati trattati o meno con nucleasi micrococcica (MNase) per 30 min a 28°C. Gli estratti proteici sono stati poi incubati con GST-Tat o GST ed i complessi proteici sono stati analizzati per Western blotting con anticorpi anti-HA ed anti-GST. *D.* Rappresentazione schematica della proteina Tat selvatica e dei relativi mutanti Tat C(22, 25, 27)A e Tat R(49-57)A. *E.* Le cellule HeLa (1×10^6) sono state trasfettate con p3xFLAG-CMV-Tat, p3xFLAG-CMV-Tat R(49-57)A, p3xFLAG-CMV-Tat C(22, 25, 27)A (5 μ g). Gli estratti cellulari sono stati ottenuti 48h dopo la trasfezione ed incubati con le proteine ricombinanti GST-I κ B- α e GST. I complessi proteici sono stati analizzati per Western blotting con anticorpi anti-FLAG oppure anti-GST. *F.* Cellule HeLa (1×10^6) sono state trasfettate con p3xFLAG-CMV-Tat, p3xFLAG-CMV-Tat R(49-57)A, p3xFLAG-CMV-Tat C(22, 25, 27)A (5 μ g) in presenza od assenza di pCMV4-HA-I κ B- α (5 μ g). Gli estratti cellulari sono stati immunoprecipitati con l'anticorpo anti-FLAG o l'isotipo di controllo (NMS). Gli immunocomplessi sono stati analizzati per Western blotting con anticorpi anti-FLAG oppure anti-GST.

3.4 Tat lega la sesta anchirina di I κ B- α

Per determinare la regione di I κ B- α che lega la proteina Tat, sono stati prodotti, per trascrizione/traduzione *in vitro*, I κ B- α ed i relativi mutanti marcati con il radioisotopo dello zolfo [S^{35}]. Tali proteine sono state incubate con le proteine ricombinanti GST oppure GST-Tat. La proteina GST-Tat legava le proteine I κ B- α 1-317 ed I κ B- α 1-269 (Fig. 9A, corsie 1 e 2), mentre non legava la proteina I κ B- α 1-263. I mutanti I κ B- α 72-287, I κ B- α 120-317, I κ B- α 243-317 ed I κ B- α 72-287 L(272, 274, 277)A erano, invece, capaci di legare la Tat (Fig. 9A, corsie 4-7). Come controllo, I κ B- α 1-317 e relativi mutanti non legavano la sola proteina GST (Fig. 9A, corsie 6-8). Tali risultati, insieme, indicano, che la sequenza di I κ B- α dall'amminoacido 263 al 269, entro la sesta anchirina di I κ B- α , era richiesta per il legame al transattivatore Tat.

Tramite un'analisi bioinformatica, eseguita mediante il programma di allineamento multiplo di sequenze CLUSTALW (<http://align.genome.jp>), abbiamo osservato che la sesta anchirina di I κ B- α è molto divergente dalle altre 5 anchirine di I κ B- α e dalle anchirine presenti nella famiglia delle proteine I κ B (p100, p105, I κ B- γ , I κ B- ϵ e Bcl-3) (Fig. 9B, C). In particolare, la sequenza TRIQQQL (sequenza dall'amminoacido 263 al 269 di I κ B- α), presente nella sesta anchirina e richiesta per il legame a Tat, è assente sia nelle altre 5 anchirine di I κ B- α che nelle anchirine della famiglia delle proteine I κ B (Fig. 9B, C). Ampliando l'analisi bioinformatica, utilizzando il programma FUZZPRO (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/fuzzpro.html>), abbiamo osservato che la sequenza TRIQQQL non era presente nell'intero proteoma umano, tranne che nella sesta anchirina di I κ B- α . Inoltre, in accordo con questi dati, i due membri della famiglia delle proteine I κ B, p105 e p100, che mostrano la maggiore identità di sequenza con la sesta anchirina di I κ B- α , non erano in grado di legare Tat per GST *pull-down* (Fig. 9D, corsie 1 e 4). Presi insieme questi dati suggeriscono che la sesta anchirina di I κ B- α contiene una sequenza unica e divergente rispetto alle altre anchirine, che potrebbe rappresentare un sito privilegiato per il legame a Tat.

Inoltre, questa sequenza potrebbe contribuire a formare una struttura peculiare, richiesta per il legame a Tat.

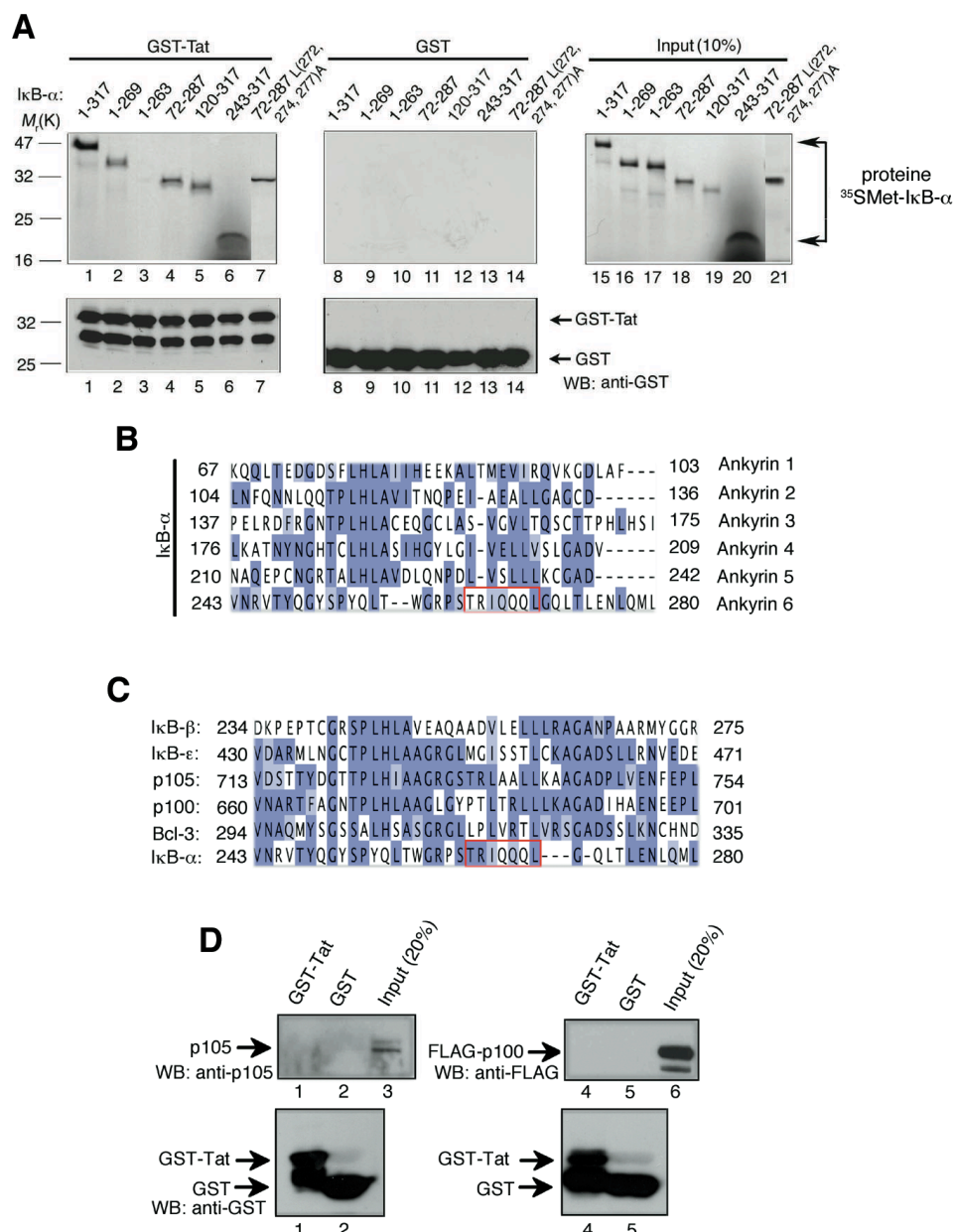


Fig. 9 – Tat lega la sesta anchirina di IκB-α.

A. Le proteine tradotte *in vitro* e marcate con metionina-[S³⁵] sono state incubate con le proteine ricombinanti GST-Tat o GST. I complessi proteici ottenuti per GST *pull-down* sono stati separati mediante SDS-PAGE al 12% e analizzati per autoradiografia e per western blotting con anticorpi anti-GST. *B.* Allineamento multiplo della sesta anchirina con le altre cinque anchirine della proteina IκB-α (*B*) oppure con le anchirine delle proteine appartenenti alla famiglia IκB (*C*) mediante il programma CLUSTALW. I numeri si riferiscono alla sequenza amminoacidica delle proteine in esame. I quadrati blu scuro indicano le identità di sequenza mentre i quadrati blu chiaro indicano amminoacidi con stesse caratteristiche chimico-fisiche. Nel riquadro rosso è riportata la sequenza TRIQQQL che lega la proteina Tat, che è unica e divergente dalla sequenza della altre anchirine. *D.* Le proteine della famiglia IκB, p100-FLAG e p105, tradotte *in vitro*, sono state incubate con le proteine

ricombinanti GST e GST-Tat. I complessi proteici sono stati analizzati per Western blotting con anticorpi anti-p105 (corsia 1-3), anti-FLAG (corsie 4-6) ed anti-GST.

3.5 I κ B- α provoca la traslocazione di Tat dal nucleo al citoplasma

La distribuzione intracellulare di I κ B- α e di Tat è stata osservata per microscopia confocale. Cellule HeLa sono state trasfettate con i plasmidi esprimenti le proteine FLAG-Tat, HA-I κ B- α ed i relativi mutanti. Quando trasfettata singolarmente, la proteina Tat mostrava una localizzazione intracellulare nucleare; I κ B- α 1-317 era, invece, prevalentemente citoplasmatica (Fig. 10A); tale risultato è stato confermato da un'analisi di immunofluorescenza condotta su un campione rappresentativo costituito da trenta cellule per ogni trasfezione (Fig. 11). Quando co-trasfettate, la proteina Tat ed I κ B- α 1-317 co-localizzavano nel citoplasma e nella zona perinucleare (Fig. 10A ed 11). La proteina mutante I κ B- α 120-317, privo sia della regione N-NES che della regione NLS, ed I κ B- α 1-269, privo della regione C-NES, erano prevalentemente citoplasmatiche e non influenzavano la localizzazione nucleare di Tat (Fig. 10A ed 11). La proteina I κ B- α 72-287, privo della regione N-NES, mostrava una localizzazione citoplasmatica e determinava la traslocazione di Tat dal nucleo al citoplasma nel 50% di cellule analizzate (Fig. 10A ed 11). Le proteine mutanti I κ B- α 72-269 ed I κ B- α 72-287 L(272, 274, 277)A, prive delle regioni N-NES e C-NES, mostravano una localizzazione sia nucleare che citoplasmatica e non influenzavano la localizzazione nucleare di Tat (Fig. 10A ed 11). Non è stata osservata nessuna differenza nell'espressione intracellulare della proteina I κ B- α selvatica e dei relativi mutanti (Fig. 10B). Questi risultati suggeriscono che I κ B- α promuove la traslocazione di Tat dal

nucleo al citoplasma e che tale attività richiede che le sequenze NLS e N-NES di I κ B- α siano funzionali.

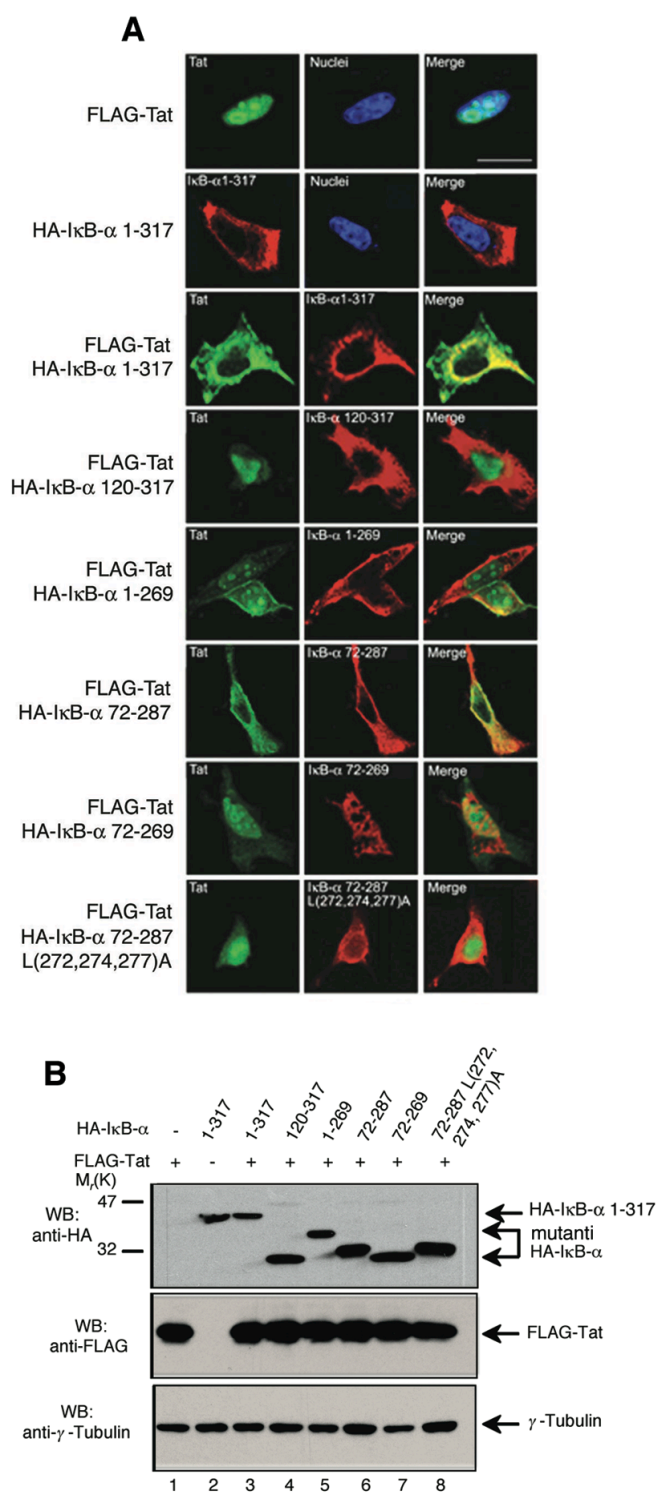


Fig. 10 – I κ B- α causa la traslocazione di Tat dal nucleo al citoplasma.
A. Le cellule HeLa (3×10^5) sono state trasfettate con p3xFLAG-CMV-Tat (3 μ g) in presenza od assenza di pCMV4-HA-I κ B- α 1-317, pCMV4-HA-I κ B- α

120-317, pCMV4-HA-I κ B- α a 1-269, pCMV4-HA-I κ B- α 72-287, pCMV4-HA-I κ B- α 72-269 oppure pCMV4-HA-I κ B- α 72-287 L(272, 274, 277)A (3 μ g). Le cellule sono state analizzate per microscopia confocale come descritto in Materiali e metodi. La barra bianca corrisponde a 10 μ m. *B*. Estratti proteici da HeLa trasfettate come mostrato in *A*, sono stati analizzati per Western blotting con anticorpi anti-HA, anti-FLAG ed anti- γ -tubulina.

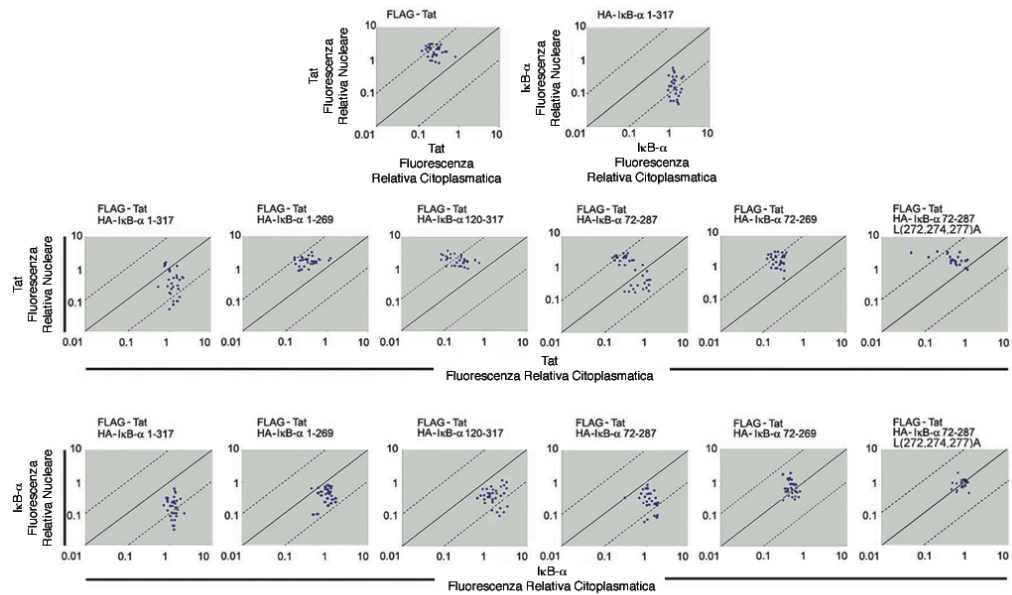


Fig. 11 – Analisi della localizzazione intracellulare di Tat ed I κ B- α mediante immuno-fluorescenza.

Cellule HeLa sono state trasfettate come descritto in figura 7A. L'analisi è stata condotta su un campione rappresentativo costituito da trenta cellule. Nei vari pannelli in figura ogni punto rappresenta il valore di fluorescenza relativa nucleare o citoplasmatica di Tat o di I κ B- α di una singola cellula. La diagonale continua indica un valore di fluorescenza relativa nucleare o citoplasmatica uguale (Fluorescenza Relativa Nucleare/Fluorescenza Relativa Citoplasmatica = 1/1); Le linee tratteggiate superiori ed inferiori indicano un rapporto tra Fluorescenza Relativa Nucleare/Fluorescenza Relativa Citoplasmatica pari a 10/1 oppure 1 a 10, rispettivamente.

Per confermare ulteriormente il ruolo di I κ B- α nella traslocazione di Tat dal nucleo al citoplasma, abbiamo costruito il mutante I κ B- α 1-317 N/C NES, che porta sostituzioni di leucine cruciali per il funzionamento della N-NES (I52A, I54A) e della C-NES [L(272, 274, 277) A] in alanine (25, 29).

I κ B- α N/C NES, per microscopia confocale, mostrava una distribuzione prevalentemente nucleare e non modificava la localizzazione nucleare della proteina Tat (Fig. 12A, B). Inoltre, tale mutante non era in grado di inibire la transattivazione mediata da Tat dell'LTR di HIV-1 privo dei siti per NF- κ B (Fig. 12C), sebbene fosse in grado di associarsi con la proteina GST-Tat in esperimenti di *GST-pull down* (Fig. 12D, corsia 2). Questi risultati, insieme, confermano che I κ B- α inibisce la proteina Tat, modificandone la localizzazione intracellulare mediante traslocazione dal nucleo al citoplasma.

Abbiamo, successivamente, verificato l'effetto della leptomicina B, un inibitore dell'esporto nucleare (55), sull'inibizione di Tat ad opera di I κ B- α . La leptomicina B causava, in cellule MEF p50^{-/-} p65^{-/-}, la mancata inibizione della proteina Tat da parte di I κ B- α (Fig. 13, corsia 2 e 3, e corsie 5 e 6), anche se non influenzava significativamente il livello della transattivazione mediata da Tat dell'LTR privo dei siti per NF- κ B (Fig. 13, corsie 2 e 5).

Tali risultati indicano che l'inibizione dell'esporto nucleare, dovuto alla leptomicina B, comporta la mancata capacità di I κ B- α di traslocare la proteina Tat dal nucleo al citoplasma, che correla con la mancata inibizione di Tat da parte di I κ B- α .

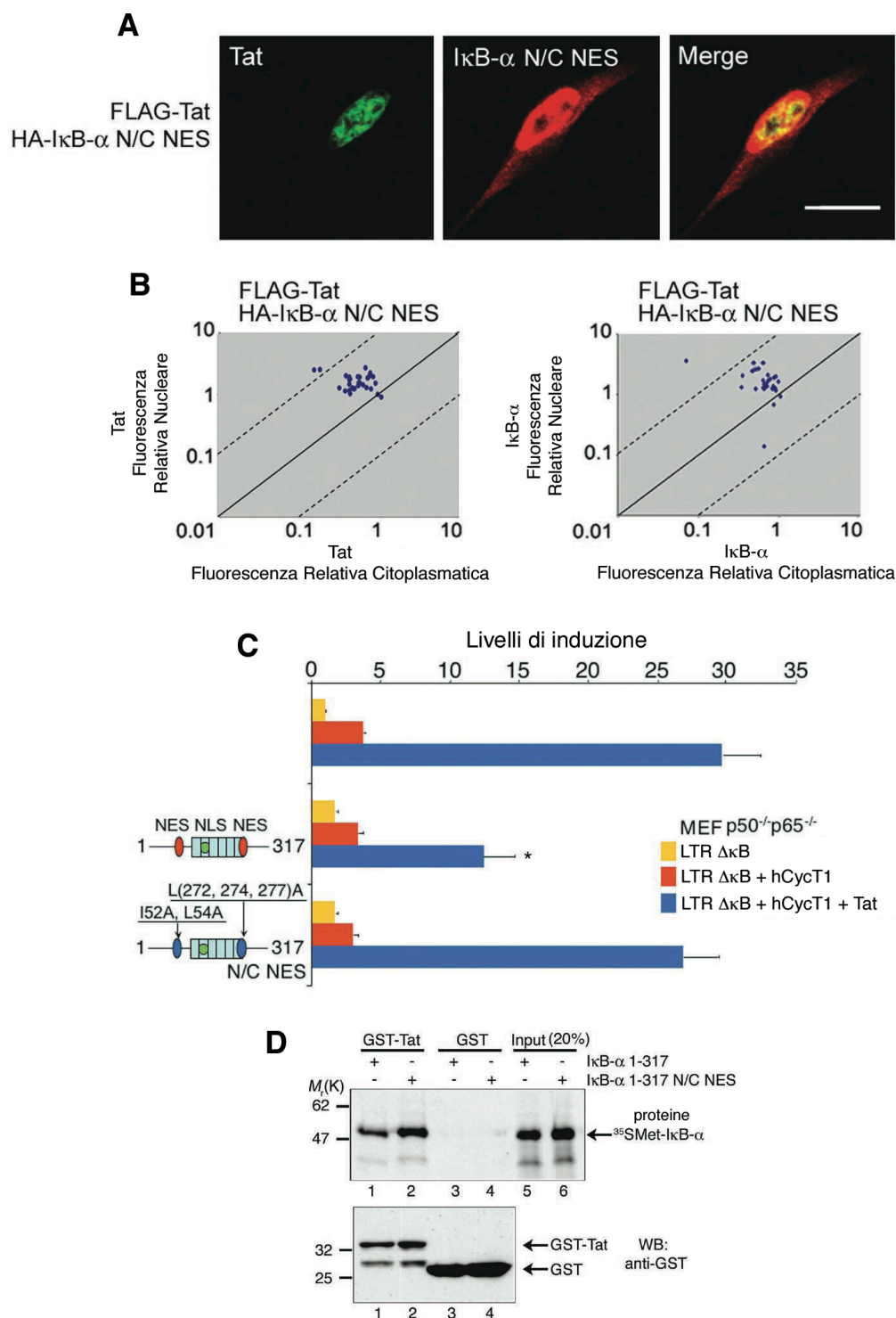


Fig. 12 – L' attività di esportazione nucleare di IκB-α è richiesta per l'inibizione e la traslocazione dal nucleo al citoplasma di Tat.

A. Le cellule HeLa (3×10^5) sono state trasfettate con p3xFLAG-CMV-Tat (3 μ g) in presenza od assenza di pCMV4-HA-IκB-α 1-317 N/C NES (3 μ g). Le cellule sono state analizzate per microscopia confocale come descritto in *Materiali e metodi*. La barra bianca corrisponde a 10 μ m. *B.* L'analisi della localizzazione intracellulare di Tat ed IκB-α 1-317 N/C NES è stata condotta

come descritto in figura 8. C. Cellule MEF (3×10^5) sono state trasfettate con pLTR/*luc*- Δ NF- κ B (0,5 μ g), con o senza p3xFLAG-CMV-Tat (0,5 μ g), pRc/CMV-HA-hCycT1 (0,5 μ g) e pCMV4-HA-I κ B- α 1-317 oppure pCMV4-HA-I κ B- α 1-317 N/C NES (2 μ g). L'attività luciferasi è stata misurata 48h dopo la trasfezione. Gli asterischi indicano un'inibizione statisticamente significativa secondo il test *t* di Student (I κ B- α 1-317, $P = 0.0017$) D. Le proteine I κ B- α 1-317 ed I κ B- α 1-317 N/C NES tradotte *in vitro* e marcate con metionina-[S^{35}], sono state incubate con le proteine ricombinanti GST-Tat o GST. I complessi proteici ottenuti per GST *pull-down* sono stati separati mediante SDS-PAGE al 12% e analizzati per autoradiografia e per western blotting con anticorpi anti-GST.

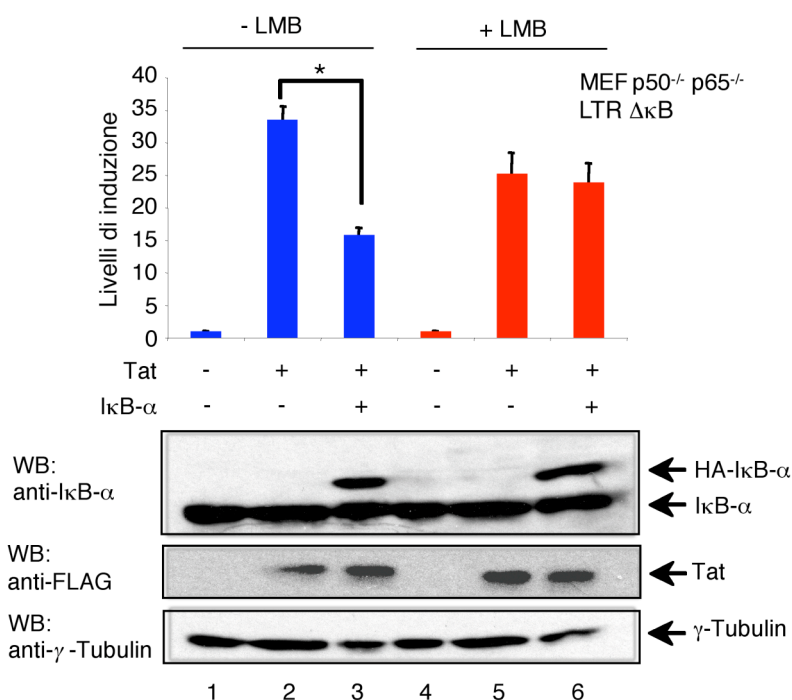


Fig. 13 – La leptomicina B (LMB), un inibitore dell'esportazione nucleare causa la perdita dell'attività inibitoria di I κ B- α su Tat.

Cellule MEF (3×10^5) sono state trasfettate con pLTR/*luc*- Δ NF- κ B (0,5 μ g), con o senza p3xFLAG-CMV-Tat (0,5 μ g), pRc/CMV-HA-hCycT1 (0,5 μ g) e pCMV4-HA-I κ B- α 1-317 (2 μ g). Dopo la trasfezione le cellule sono state trattate o meno con LMB (20 nM). I valori luciferasi sono stati misurati negli estratti cellulari 18 ore dopo trasfezione. Gli asterischi indicano un'inibizione statisticamente significativa secondo il test *t* di Student (I κ B- α 1-317, $P = 0.001$). Gli estratti proteici sono stati analizzati per Western blotting con anticorpi anti-I κ B- α (C-21), anti-FLAG e anti- γ -Tubulina.

DISCUSSIONE

Questo studio fornisce ulteriori dettagli circa il meccanismo di inibizione dell'espressione del virus HIV-1 ad opera del repressore I κ B- α . In questo lavoro, abbiamo mostrato come I κ B- α reprime l'attività del transattivatore virale Tat indipendentemente dalla repressione del fattore trascrizionale NF- κ B. In particolare, I κ B- α si associa fisicamente con la proteina Tat e modifica la sua localizzazione intracellulare da nucleare a citoplasmatica, bloccando così, la sua attività trascrizionale.

L'associazione di I κ B- α con la regione di Tat ricca in arginine non è sufficiente ad impedire l'attività transattivante di Tat. Infatti, i mutanti I κ B- α 120-317 e I κ B- α 1-269 legano la proteina Tat senza, però, essere in grado di inibirla (Fig. 14A). Invece, l'inibizione di Tat, correla con l'attività di I κ B- α di esportazione nucleare, che richiede, nel caso di Tat, la sequenza NLS (che va dall'amminoacido 110 al 120), la sequenza C-NES (dall'amminoacido 265 al 277) e il sito di legame alla proteina Tat (identificato nella sequenza TRIQQQL dall'amminoacido 263 al 269) (Fig. 14A). In accordo con tali risultati, il mutante I κ B- α N/C NES, che contiene l'intera sequenza di I κ B- α (dall'amminoacido 1 al 317), priva sia della sequenza NES ammino-terminale sia della sequenza NES carbossi-terminale funzionale, non è in grado di inibire l'attività trascrizionale di Tat.

Presi insieme, tali risultati suggeriscono che I κ B- α lega la proteina Tat nel nucleo e determina la traslocazione di essa dal nucleo al citoplasma, dove il complesso è prevalentemente ritenuto (Fig. 14B).

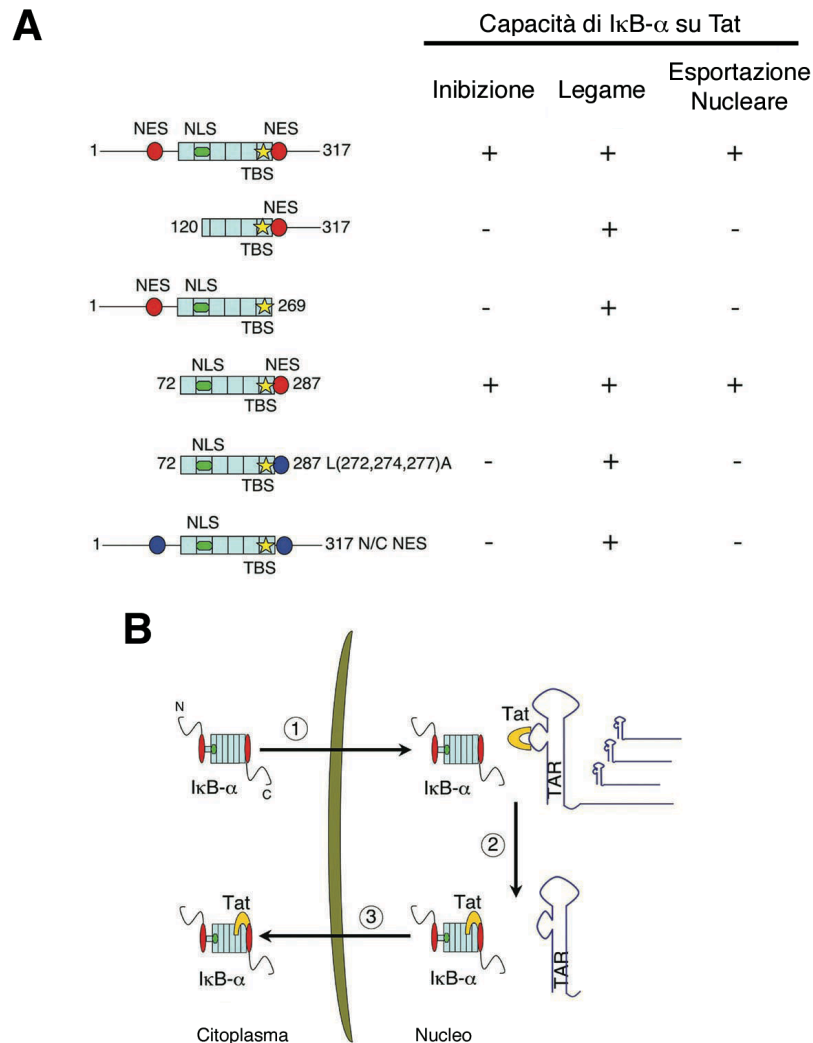


Fig. 14 – Modello dell'inibizione di Tat ad opera di IκB-α.

A. Schema riassuntivo delle capacità di mutanti rilevanti di IκB-α sulla proteina Tat. *B.* Rappresentazione schematica del meccanismo di inibizione di Tat ad opera di IκB-α. Il repressore IκB-α entra nel nucleo (fase 1), dove associa il transattivatore virale Tat (fase 2), e determina la traslocazione di Tat dal nucleo al citoplasma (fase 3). Il segnale di localizzazione nucleare, il segnale di esportazione nucleare C-terminale ed il sito di legame a Tat (TBS) di IκB-α sono richiesti per inibire Tat.

4.1 Rilevanza dell'interazione IκB-α a/Tat nel ciclo virale di HIV-1

L'evidenza che IκB-α inibisce sia l'attività trascrizionale di NF-κB che del transattivatore virale Tat solleva la domanda sul perché IκB-α endogeno non blocca l'espressione di HIV-1 in corso di infezione virale.

I κ B- α è rapidamente degradato a seguito dell'ingresso del virus nella cellula in quanto il legame della proteina di membrana virale gp120 con il recettore di membrana cellulare CD4 trasduce il segnale di degradazione di I κ B- α e di attivazione di NF- κ B (56-58). Grazie alla degradazione di I κ B- α avviene l'espressione ottimale di HIV-1 dipendente da NF- κ B e conseguente produzione di Tat. Successivamente, Tat induce l'espressione di geni di citochine infiammatorie, quali IL-6 (59) e TNF- α (60), che a loro volta inducono degradazione di I κ B- α ed attivazione di NF- κ B (61, 62). Inoltre, Tat attiva NF- κ B tramite induzione della chinasi NIK (NF- κ B inducing kinase) a sua volta coinvolta nell'attivazione di IKK, che è responsabile della fosforilazione e degradazione di I κ B- α (63). Questo circuito di eventi perpetua la degradazione di I κ B- α e la produzione di Tat assicurando la progressione dell'infezione virale. La controprova è l'evidenza che la produzione di una proteina I κ B- α non degradabile nella cellula infetta blocca l'espressione e replicazione di HIV-1 (42, 43).

L'interazione fisica e funzionale di I κ B- α e Tat ci fornisce un nuovo meccanismo di regolazione della trascrizione di HIV-1. Infatti, il rapporto intracellulare tra la concentrazione di I κ B- α e di Tat potrebbe influenzare l'espressione di geni *target*, come ad esempio HIV-1.

In questo scenario, mentre la proteina I κ B- α endogena non è in grado di bloccare l'espressione virale a causa della proteolisi proteasoma-dipendente, indotta nel corso d' infezione dall'espressione di varie citochine, un mutante di I κ B- α resistente alla proteolisi, come il mutante I κ B- α S32/36A, capovolgerebbe l' equilibrio tra Tat ed I κ B- α che si stabilisce in corso di

infezione virale, determinando una forte repressione di HIV-1 per il duplice effetto sulle attività trascrizionali di NF- κ B e Tat.

Quindi, questo nuovo meccanismo di repressione trascrizionale del virus HIV-1, potrebbe essere di grande aiuto nello sviluppo di nuove classi di inibitori di HIV-1.

In particolare, la sequenza minima inibitoria di I κ B- α (amminoacidi dal 72 al 287) rappresenta una struttura modello per disegnare peptidi inibitori che sono in grado di bloccare l'attivazione trascrizionale del virus HIV-1.

Il meccanismo di inibizione del transattivatore virale Tat ad opera di I κ B- α è simile al meccanismo di inibizione di NF- κ B. In entrambi i casi, I κ B- α si associa con questi fattori trascrizionali nel nucleo e causa la traslocazione di essi dal nucleo al citoplasma.

Questi eventi, insieme, regolano negativamente le attività trascrizionali di Tat e di NF- κ B e risultano in una forte attenuazione di HIV-1 mediata da I κ B- α .

Quindi, farmaci che aumentano la stabilità della proteina I κ B- α endogena, e quindi regolatori negativi dell'attività di NF- κ B e Tat, come ad esempio inibitori di IKK e del proteasoma, potrebbero fornire un utile strumento da affiancare alla convenzionale terapia anti-retrovirale (HAART).

BIBLIOGRAFIA

1. Wu, Y. (2004) *Retrovirology* 1, 13
2. Pereira, L. A., Bentley, K., Peeters, A., Churchill, M. J., and Deacon, N. J. (2000) *Nucleic Acids Res* 28, 663-668
3. Sodroski, J., Rosen C., Wong-Staal F., Salahuddin S.Z., Popovic M., Arya S., Gallo R. C., Haseltine W. A. (1985). *Science* 227, 171-173.
4. Jeang, K. T. (1996) *Molecular Virology Section*, 3-10.
5. Jones, K. A, Peterlin, B. M. (1994) *Annu Rev Biochem.* 63, 717-743.
6. Williams, S. A., Kwon, H., Chen, L. F., Greene, W. C., (2007) *J Virol* 81, 6043-56
7. Drapkin, R., Reardon, J. T., Ansari, A., Huang, J. C., Zawel, L., Ahn, K., Sancar, A., Reinberg, D. (1994) *Nature* 368, 769-772.
8. Karn, J (1999) *J Mol Biol* 293, 235-254.
9. Ping, Y. H., Rana, T. M. (1999) *J Biol Chem* 274, 7399-7404.
10. Yedavalli, V. S., Benkirane, M., Jeang, K. T. (2003) *J Biol Chem* 278(8), 6404-6410.
11. Barboric, M., Nissen, R. M., Kanazawa, S., Jabrane-Ferrat, N., Peterlin, B. M. (2001) *Mol Cell* 8, 327-337.
12. Benkirane, M., Chun, R. F., Xiao, H., Ogryzko, V. V., Howard, B. H., Nakatani, Y., and Jeang, K. T. (1998) *J Biol Chem* 273, 24898-24905
13. Marzio, G., Tyagi, M., Gutierrez, M. I., and Giacca, M. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13519-13524
14. Hottiger, M. O., and Nabel, G. J. (1998) *J Virol* 72, 8252-8256
15. Theilen GH, Zeigel RF, Twiehaus MJ. (1966) *J Natl Cancer Inst* 37, 731-743.
16. Ghosh, S., May, M. J., Kopp, E. B. (1998) *Annu Rev Immunol* 16, 225-260.
17. Chen, F. E., Ghosh, G. (1999) *Oncogene* 18, 6845-6852.
18. Karin, M. (1999) *Oncogene* 18, 6867-6874.
19. Latimer, M., Ernst, M. K., Dunn, L. L., Drutskaya, M., Rice, N. R. (1998) *Mol Cell Biol.* 18, 2640-2649.
20. Le Bail, O., Schmidt-Ullrich, R., Israël, A. (1993) *Embo J.* 12, 5043-5049.
21. Sun, S. C., Ganchi, P. A., Ballard, D. W., Greene, W. C. (1993) *Science* 259, 1912-1915.
22. Verma, I. M., Stevenson, J. K., Schwarz, E. M., Van Antwerp, D., Miyamoto, S. (1995) *Genes Dev.* 9, 2723-2735.
23. Karin, M., Ben-Neriah, Y. (2000) *Annu Rev Immunol* 18, 621-663.
24. Johnson, C., Van Antwerp, D., and Hope, T. J. (1999) *Embo J* 18, 6682-6693
25. Huang, T. T., Kudo, N., Yoshida, M., and Miyamoto, S. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1014-1019
26. Tam, W. F., Lee, L. H., Davis, L., and Sen, R. (2000) *Mol Cell Biol* 20, 2269-2284
27. Prigent, M., Barlat, I., Langen, H., and Dargemont, C. (2000) *J Biol Chem* 275, 36441-36449
28. Sachdev, S., Hoffmann, A., and Hannink, M. (1998) *Mol Cell Biol* 18, 2524-2534

29. Turpin, P., Hay, R. T., and Dargemont, C. (1999) *J Biol Chem* 274, 6804-6812
30. Sachdev, S., Bagchi, S., Zhang, D. D., Mings, A. C., and Hannink, M. (2000) *Mol Cell Biol* 20, 1571-1582
31. Arenzana-Seisdedos, F., Turpin, P., Rodriguez, M., Thomas, D., Hay, R. T., Virelizier, J. L., and Dargemont, C. (1997) *J Cell Sci* 110 (Pt 3), 369-378
32. Bachelier, F., Rodriguez, M. S., Dargemont, C., Rousset, D., Thomas, D., Virelizier, J. L., and Arenzana-Seisdedos, F. (1997) *J Cell Sci* 110 (Pt 22), 2883-2893
33. Sun, S., Elwood, J., Greene, W. C. (1996) *Mol Cell Biol* 16, 1058-1065.
34. Wu, B. Y., Woffendin, C., MacLachlan, I., Nabel, G. J. (1997) *J Virol* 71, 3161-3167.
35. Lin, R., Beuparlant, P., Makris, C., Meloche, S., Hiscott, J. (1996) *Mol Cell Biol* 16, 1401-1409.
36. Shumway, S. D., Maki, M., Miyamoto, S. (1999) *J Biol Chem* 274, 30874-30881.
37. Shen, J., Channavajhala, P., Seldin, D.C. , Sonenshein, G. E. (2001) *J.Immunol.* 167, 4919-4925.
38. Baldwin, A. S. (1996) *Annu Rev Immunol* 14, 649-683.
39. Beg, A. A., Ruben, S. M., Scheinman, R.I., Haskill, S., Rosen, C. A., Baldwin, A. S. (1992) *Genes Dev* 6, 1899-1913.
40. Di Donato, J. A., Mercurio, F., Rosette, C., Wu-Li, J., Suyang, H., Ghosh, S., Karin, M. (1996) *Mol Cell Biol* 16, 1295-1304.
41. DiDonato, J. A., Mercurio, F., Karin, M. (1995) *Mol Cell Biol* 15, 1302-1311.
42. Quinto, I., Mallardo, M., Baldassarre, F., Scala, G., Englund, G., and Jeang, K. T. (1999) *J Biol Chem* 274, 17567-17572
43. Palmieri, C., Trimboli, F., Puca, A., Fiume, G., Scala, G., Quinto, I. (2004) *Retrovirology* 1, 45
44. Leonard, J., Parrott, C., Buckler-White, A. J., Turner, W., Ross, E. K., Martin, M. A., and Rabson, A. B. (1989) *J Virol* 63, 4919-4924
45. Berkhout, B., and Jeang, K. T. (1992) *J Virol* 66, 139-149
46. Chen, B. K., Feinberg, M. B., and Baltimore, D. (1997) *J Virol* 71, 5495-5504
47. O'Doherty, U., Swiggard, W. J., and Malim, M. H. (2000) *J Virol* 74, 10074-10080
48. Brussel, A., and Sonigo, P. (2003) *J Virol* 77, 10119-10124
49. Demarchi, F., d'Adda di Fagagna, F., Falaschi, A., and Giacca, M. (1996) *J Virol* 70, 4427-4437
50. Carlotti, F., Chapman, R., Dower, S. K., and Qvarnstrom, E. E. (1999) *J Biol Chem* 274,37941-37949
51. Sha, W. C., Liou, H. C., Tuomanen, E. I., and Baltimore, D. (1995) *Cell* 80, 321-330
52. Beg, A. A., Sha, W. C., Bronson, R. T., Ghosh, S., and Baltimore, D. (1995) *Nature* 376,167-170
53. Hoffmann, A., Leung, T. H., and Baltimore, D. (2003) *Embo J* 22, 5530-5539

54. Garber, M. E., Wei, P., KewalRamani, V. N., Mayall, T. P., Herrmann, C. H., Rice, A. P., Littman, D. R., and Jones, K. A. (1998) *Genes Dev* 12, 3512-3527
55. Coiras, M., Lopez-Huertas, M. R., Rullas, J., Mittelbrunn, M., and Alcamí, J. (2007) *Retrovirology* 4, 56
56. McElhinny, J. A., MacMorrán, W. S., Bren, G. D., Ten, R. M., Israel, A., and Paya, C. V. (1995) *J Virol* 69, 1500-1509
57. DeLuca, C., Roulston, A., Koromilas, A., Wainberg, M. A., and Hiscott, J. (1996) *J Virol* 70, 5183-5193
58. Asin, S., Taylor, J. A., Trushin, S., Bren, G., and Paya, C. V. (1999) *J Virol* 73, 3893-3903
59. Scala, G., Ruocco, M. R., Ambrosino, C., Mallardo, M., Giordano, V., Baldassarre, F., Dragonetti, E., Quinto, I., Venuta, S. (1994) *J Exp Med* 179, 961-971.
60. Buonaguro, L., Buonaguro, F. M., Giraldo, G., Ensoli, B. (1994) *J Virol* 68, 2677-2682.
61. Westendorp, M. O., Shatrov, V. A., Schulze-Osthoff, K., Frank, R., Kraft, M., Los, M., Krammer, P. H., Dröge, W., Lehmann, V. (1995) *Embo J* 14, 546-554.
62. Ambrosino, C., Ruocco, M. R., Chen, X., Mallardo, M., Baudi, F., Trematerra, S., Quinto, I., Venuta, S., Scala, G. (1997) *J Biol Chem* 272, 14883-14892.
63. Li, X., Josef, J., Marasco, W. A. (2001) *Biochem Biophys Res Commun* 286, 587-594.

RINGRAZIAMENTI

Sono molto grato alla Prof.ssa Ileana Quinto che mi ha trasmesso l'entusiasmo e la passione per la ricerca scientifica e mi ha fornito grande supporto ed utili consigli. Ringrazio il Prof. Giuseppe Scala per il suo giudizio critico. Un grazie particolare al Prof. Mario Masullo per il costante “aiuto informatico” e per i suoi inestimabili consigli sulla purificazione delle proteine ricombinanti. Ringrazio la Prof.ssa Franca Esposito per gli utilissimi suggerimenti sulla stesura della tesi. Vorrei ringraziare particolarmente la Dott.ssa Antimina Puca e il Dott. Camillo Palmieri che mi hanno aiutato a sviluppare il mio progetto di ricerca. Un grande ringraziamento a tutti i ragazzi del laboratorio, per questi anni che abbiamo trascorso insieme, ed in particolare alle Dott.sse Carmen Spatuzza, Emanuela Di Salle ed Annamaria de Laurentiis e al Dott. Marco Schiavone. Un ulteriore ringraziamento al Dott. Maurizio Renna e al Prof. Massimo Mallardo per tutte le “discussioni scientifiche” alla macchinetta del caffè.